Een nieuwe methode ter bepaling van den Generatieduur der Bacteriën en eenige van hare toepassingen. ❋ ❋

LAW LIBRARY
SAN FRANCISCO

G. W. Boland.

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/einnieuwmethodet0000gwbo

EEN NIEUWE METHODE TER BEPALING VAN DEN GENERATIEDUUR DER BACTERIËN EN EENIGE VAN HARE TOEPASSINGEN.

Een nieuwe methode ter bepaling van den Generatieduur der Bacteriën en eenige van hare toepassingen.

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

Doctor in de Geneeskunde

AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM,

OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS

Dr. P. K. PEL,

Hoogleeraar in de Faculteit der Geneeskunde,

IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN DE AULA DER UNIVERSITEIT

op Maandag 28 April 1902

des namiddags ten **4** ure

DOOR

GERRIT WILLEM BOLAND,

Arts, Off. v. Gez. der 2e kl. L,

geboren te WELL, gem. Ammerzoden.

AMSTERDAM.
BOEK-, KUNST- EN HANDELSDRUKKERIJ V/H GEBR. BINGER.
1902.

Aan mijne ouders.

VOORREDE.

Bij het voleindigen van mijn proefschrift is het mij een genoegen een woord van warmen dank uit te spreken aan de Hoogleeraren, Lectoren en Privaat-Docenten der Geneeskundige en der Philosophische faculteiten aan deze Universiteit.

Bijzondere erkentelijkheid ben ik verschuldigd aan mijn Hooggeachten Promotor Prof. Saltet, die mij bij het samenstellen van dit proefschrift op zoo welwillende en vriendelijke wijze behulpzaam was. De uren, op zijn Laboratorium doorgebracht, zullen mij steeds in aangename herinnering blijven.

Ook past het mij hartelijk dank te brengen aan den Privaat-Docent Alex. Klein en den Militairen Apotheker der 1e kl. J. L. van Wermeskerken voor de belangstelling en steun, die ik van hen mocht ondervinden.

Ten slotte zij het mij vergund den Hoogedelgestrengen Heer W. T. Philipsen, Generaal-Majoor, Inspecteur van den Geneeskundigen Dienst der Landmacht, mijne erkentelijkheid te betuigen voor de welwillendheid, waarmee Z. H. E. G. mij in de gelegenheid stelde dit proefschrift te bewerken.

INHOUD.

Bladz.

Eerste Hoofdstuk.

Inleidend litteratuur overzicht 1

Tweede Hoofdstuk.

Een nieuwe methode ter bepaling van den generatieduur der bacteriën 9

Derde Hoofdstuk.

Bepalingen met de in hoofdstuk II beschreven methode . . . 23

Vierde Hoofdstuk.

Bepaling van den invloed der in culturen van verschillenden ouderdom aanwezige nadeelige momenten voor het voortbestaan en de vermeerdering van bacteriën met behulp van de nieuwe methode ter bepaling van den generatieduur . . 58

Vijfde Hoofdstuk.

Invloed van een temperatuur van 39—40° C. op den groei van Bac. diphtheriae in neutralen voedingsbouillon 71

Zesde Hoofdstuk.

Invloed van alcali en zuur op de ontwikkeling van Bact. coli commune in bouillon, nagegaan met behulp van de nieuwe methode ter bepaling van den generatieduur der bacteriën 84

EERSTE HOOFDSTUK.

INLEIDEND LITTERATUUROVERZICHT.

Generatieduur wordt genoemd de tijd, dien een bepaald micro-organisme onder bepaalde omstandigheden noodig heeft om zich te deelen, d. w. z. de tijd, waarin uit één organisme er twee ontstaan.

Pasteur deed hierover het eerste onderzoek en wel met gistcellen, wier vermeerdering in druivennat bij een temperatuur van 13° C. hij onder het microscoop bestudeerde. Na twee uren waren uit één gistcel er acht ontstaan; in dien tijd had dus driemaal een generatie plaats gevonden. Onder deze omstandigheden bedroeg de generatieduur 40 minuten. Daarna is een methode, meer voor algemeen gebruik geschikt, aangegeven door Buchner, Longard en Riedlin [1]). Zij bepaalden daarmee den generatieduur van den cholerabacil onder de meest gunstige verhoudingen, zoowel wat voedingsbodem en temperatuur als aantal organismen betreft en gingen daarbij op de volgende wijze te werk. Uit een reincultuur van vibrio cholerae in vleeschnatpeptonoplossing wordt een oogje gebracht in 50 c. c. steriele physiologische zoutsolutie; na flink schudden wordt hiervan 1 c. c. in vleeschnatpeptonoplossing geënt. Hiervan wordt, na wederom flink schudden 1 c. c. genomen tot het aanleggen van platen, waaruit door telling het aantal bacteriën

[1]) Centralbl. für Bact. u. Paras. Bd. 2. Pag. 1.

der oplossing, d. i. het beginaantal = *a*. te berekenen is. Direkt na het maken der plaatculturen wordt de oplossing gedurende eenigen tijd (2—5 uren) bij 37° C. geplaatst. Hierna worden weer plaatculturen vervaardigd, waaruit eveneens door telling het aantal organismen, d. i. het eindgetal = *b* te berekenen is. Bij bekend zijn van het beginaantal organismen = *a* en het eindaantal = *b*, benevens den tijd = T, dien zij noodig hebben om zich van *a* tot *b* te vermeerderen, is daaruit de generatieduur = G af te leiden. Noemen we namelijk het aantal generaties dat plaats gevonden heeft: *n*, dan is

$n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$, wat blijkt uit de volgende redeneering.

Uit *a* organismen ontstaan:

na 1 generatie $a \times 2$ organismen,

na 2 generaties $a \times 2 \times 2 = a \times 2^2$ organismen,

na 3 generaties $a \times 2 \times 2 \times 2 = a \times 2^3$ organismen,

. . . . . .

na n generaties $a \times 2^n$ organismen.

Waar we nu hebben: $a \times 2^n = b$

$$\text{of} \qquad 2^n = \frac{b}{a},$$

$$\text{daar is } n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}.$$

Daar in T minuten n generaties zijn ontstaan is voor één generatie noodig $\frac{T}{n}$ minuten.

$$G = \frac{T}{n}$$

Als resultaat van zijne onderzoekingen vindt Buchner onder de genoemde omstandigheden een generatieduur voor den cholerabacil, die varieert van 19′ tot 40′.

Dat deze waarden voor practische gevolgtrekkingen te

zeer uiteenloopen, behoeft geen betoog. De vraag is, wat kan de oorzaak van deze verschillen wezen. Buchner merkt zelf terecht op, dat de gevolgde methode niet alleen de schuld mag dragen. Wel worden, zooals door Hehewerth [1]) bewezen is en waarop we nader terugkomen, met de Koch'sche plaatmethode onnauwkeurigheden begaan, vooral als daarbij zooals hier de verdunningsmethode gevolgd wordt, doch de verschillen zijn te groot om niet andere oorzaken als mogelijk voorop te stellen. B. meent hoofdzakelijk de reden te moeten zoeken in het feit, dat hij niet altijd krachtige culturen ter beschikking had en dat de door herhaald overenten verzwakte organismen zich minder snel vermeerderen. Voor een deel mag dit waar zijn, al wijzen noch de resultaten van Hehewerth noch eigen onderzoekingen daarop, veel beter is de verklaring, die Max Müller [2]) er van geeft.

M. wilde den invloed van koortstemperaturen op den groei van Bac. typhosus nagaan. Klinisch belangrijke feiten leverde dit onderzoek niet op, maar wel kwam hij daardoor tot een beschouwing over den generatieduur van genoemden bacil, waarop ook door Hehewerth nader is ingegaan. Het bleek namelijk, dat wanneer men in sterielen voedingsbouillon een zekere hoeveelheid van een typhuscultuur overent, de organismen gedurende eenigen tijd zich niet vermeerderen doch daarmee eerst na korter of langer tijdsverloop beginnen, afhankelijk van den ouderdom der cultuur, waaruit werd overgeënt. Bij zeer jonge culturen is dit tijdperk van rust slechts kort, doch bij oudere (+ 16 uren) kan deze periode verlengd worden tot een uur en langer.

Deze factor nu heeft waarschijnlijk een rol gespeeld bij

---

[1]) Dissertatie 1900.

[2]) Zeitschr. für Hygiène Bd. XX. Pag 245.

de generatieduurbepalingen, door Buchner verricht. B. toch bepaalde G na verschillend langen tijd, na 120, 150 en 300 minuten. En zeer opmerkelijk is het nu, dat de hooge waarden van G voor den cholerabacil gevonden werden bij de proeven, waar G bepaald werd nadat de cultuur 120 min. bij 37° C. gegroeid was, de lage daarentegen, wanneer T grooter was genomen. Het ligt nu voor de hand, dat wanneer T kleiner is (120 min.) en er dus in dien tijd minder generaties hebben plaats gehad, het tijdperk van rust van grooteren invloed op de uitkomsten van den generatieduur is dan wanneer dit over meerdere generaties verdeeld wordt, wanneer dus T grooter is genomen. Geheel juist verklaart Müller aldus de groote schommelingen in Buchner's uitkomsten.

Met een enkel woord werd reeds gememoreerd, dat ook de onnauwkeurigheden, welke de Koch'sche plaatmethode aankleven, voor een deel de schuld van deze schommelingen dragen. Hiermee heeft ook Müller in het boven geciteerde onderzoek te kampen gehad.

Aan Alex Klein ([1]) komt nu de verdienste toe een telmethode gevonden te hebben, die wat nauwkeurigheid betreft boven de Koch'sche plaatmethode te verkiezen is en practisch evengoed uitvoerbaar. Ze behoort bij het eveneens door Klein gegeven principe van de kleuring der bacteriën in vochtigen toestand ([2]) en maakt het hoofdonderwerp uit van de onderzoekingen in het proefschrift van Hchewerth neergelegd.

H. heeft de Koch'sche plaatmethode met de microscopische telmethode van Alex Klein vergeleken en komt

([1]) Alex Klein. Eine neue mikroskopische Zählungsmethode der Bacteriën Centralbl. f. B. u. P. 1e Abt. 1900.

([2]) Id. Eine einfache Methode zur Sporenfärbung. C. f. B. u. P. 1899. Bd. XXV.

op grond van een aantal experimenten tot de volgende conclusies :

1e. Indien het aantal micro-organismen wordt bepaald volgens de methode Klein levert dit een grooter aantal op dan wanneer dit geschiedt met de plaatmethode ; wij komen dus met de methode Klein dichter bij het werkelijke aantal.

2e. De procentfout met de microscopische telmethode bij onderlinge vergelijking van verschillende waarnemingen is kleiner dan die met de plaatmethode gemaakt wordt. Als gemiddelde procentfouten zijn gevonden :

a. Onderlinge afwijking van aantallen met de methode Klein : 19,1 %.

b. Onderlinge afwijking van aantallen met de methode Koch, *zonder verdunning :* 32,6 %.

c. Met verdunning : 112 %.

3e. De procentfout, bij onderlinge vergelijking van platen met verdunning, overtreft die van platen zonder verdunning ver.

De oorzaak, dat de plaatmethode in aantal bij de methode Klein achterblijft, moet in hoofdzaak hierin gezocht worden, dat de organismen, vooral die welke zoo juist door deeling zijn ontstaan, zoo dicht bij elkaar liggen en dus meerdere bacteriën slechts één kolonie vormen.

Dat met de methode Klein gemiddeld 19,1 % fout gemaakt wordt, heeft verschillende oorzaken :

1e. Zijn in de culturen zelf de bacteriën niet volkomen gelijkmatig verdeeld ; 2e zal het geijkte oogje, waarmee geënt wordt, niet volkomen juist de bepaalde capaciteit bezitten, wat van belang is, daar met oogjes van verschillende capaciteit geënt werd ; 3e zal het oogje niet steeds dezelfde hoeveelheid cultuurvloeistof opnemen ; 4e blijven bij het vervaardigen van een telpraeparaat, wat geschiedt door een oogje met een emulsie van gelijke deelen kleurstof en

cultuurvloeistof gelijkmatig op een volkomen vetvrij dekglaasje uit te strijken, enkele bacteriën aan dat oogje hangen en 5e zal een telling van bijv. het dubbele aantal gezichtsvelden als geschiedde (50 velden tellen bleek practisch voldoende te zijn) nog dichter bij het werkelijke aantal organismen brengen.

Geleid nu door de gunstige resultaten, welke H. met de methode Klein verkreeg, vond hij hierin een middel den generatieduur van enkele micro-organismen na te gaan. Hij ging als volgt te werk.

Uit een bouilloncultuur wordt een oogje van bekende capaciteit overgeënt in 5 c. c. sterielen voedingsbouillon. Het aantal, dat men aldus inbrengt *(a)*, is gemakkelijk te berekenen door met datzelfde oogje een praeparaat volgens de methode Klein te maken en door telling onder het microscoop te bepalen hoeveel bacteriën in de cultuur, waar*uit* het oogje genomen werd, aanwezig zijn. Na verschillende tijden van groei der geënte cultuur bepaalt men op dezelfde wijze het dan aanwezige aantal organismen (*b*). Het is noodig, om een goed telpraeparaat te verkrijgen, daarmee te wachten tot de bouillon licht troebel is geworden. Bij bekend zijn van a, b en T zijn uit de door Buchner aangegeven formules (pag. 2) n en G te berekenen.

Aldus zijn door Hehewerth voor Bact. coli commune, geënt in 5 c. c. voedingsbouillon en gegroeid bij 37° C waarden voor den generatieduur gevonden, die uiteenloopen van 21′ 18″ tot 26′ 45″. Zeer gunstige resultaten dus in vergelijking met Buchner's uitkomsten voor den cholerabacil. Als voornaamste oorzaak voor deze schommelingen neemt H. kleine verschillen in den voedingsbodem aan, die door lang staan in hoofdzaak wat de reactie betreft lichte veranderingen kan ondergaan.

Bij H.'s proeven geschiedden de overentingen uit 18—24 uur oude culturen; de straks genoemde periode van rust

zal dus wel een kleine invloed op de uitkomsten hebben; daar T evenwel groot genoeg genomen is (4—5 uren) en gemiddeld in dien tijd 10 generaties hebben plaats gehad, zal deze invloed niet groot zijn. Tevens kon H. constateeren, dat wanneer Bact. coli comm. slechts eenmaal van een agarcultuur in bouillon is overgeënt, de waarden voor G. eenige minuten hooger uitvallen dan wanneer het organisme herhaalde malen achtereen in deze vloeistof is gekweekt. Door herhaald overenten in eenzelfde cultuurmedium zou dus een organisme hieraan meer gaan gewennen.

Entte hij uit culturen, die 48 uur oud waren, dan werd ook voor G. een hoogere waarde gevonden. Dit heeft evenwel een andere oorzaak en wel 1°. is het tijdperk van rust grooter na overenting uit een oudere cultuur en 2°. zijn, wat uit verdere experimenten blijkt, in een 48 uur oude cultuur reeds afgestorven organismen aanwezig, die wel microscopisch worden meegeteld doch natuurlijk niet in staat zijn zich te vermenigvuldigen. Het beginaantal *a* is dan grooter als het werkelijke aantal levende individuen bedraagt en daardoor krijgt men een hoogere waarde voor G.

De opmerking van Buchner, dat men voor de bepaling van *G.* niet te lang moet wachten, wordt ook door H. beaamd. Uit proeven met Bact. coli comm. geënt in bouillon en gegroeid bij 37° C. blijkt, dat na zekeren tijd (6—8 uren) een maximum van aantal bereikt wordt; dit maximum blijft tot na 24 uren constant en daarna volgt weer een stijging in aantal. 't Is duidelijk, dat voor de bepaling van G dit maximum nog niet bereikt mag zijn, daar men ook dan voor G. een te hooge waarde vindt. Het aantal bacteriën toch blijft hetzelfde en de tijd staat niet stil, zoodat uit de formule $G = \frac{T}{n}$ de generatieduur verlengd zou schijnen.

Uit het meegedeelde blijkt dus, dat de meest nauwkeurige uitkomsten verkregen worden, wanneer men het eindgetal (*b*) bepaalt na een tijd, waarin reeds een betrekkelijk groot aantal generaties heeft plaats gevonden en toch nog niet het maximum van aantal bereikt is. De periode van rust is dan, doordat ze over een grooter aantal generaties verdeeld wordt, van minder beteekenis en het tijdstip is nog niet bereikt, waarop een stilstand in de vermeerdering intreedt. Stellen we den gang van ontwikkeling door een curve voor, dan hebben we eerst een opstijgend, daarna een horizontaal en dan weer een stijgend gedeelte. Het einde van de eerste stijging is dus het geschikte oogenblik de bepaling te verrichten. Practisch is dit het tijdstip, waarop de bouillon een lichte troebeling laat zien. Dan bestaat ook nog niet het gevaar, dat omzettingen door de organismen in hun cultuurmedium teweeg gebracht een merkbaar schadelijken invloed op de ontwikkeling uitoefenen.

TWEEDE HOOFDSTUK.

EEN NIEUWE METHODE TER BEPALING VAN DEN GENERATIEDUUR DER BACTERIËN.

Een nadere beschouwing van de door Buchner, Longard en Riedlin aangegeven formule: $n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$, welke formule het uitgangspunt vormt voor de berekening van den generatieduur, heeft me er toe gebracht een methode te bedenken, die in eenvoudigheid en nauwkeurigheid niet onderdoet voor de tot nu toe gevolgde methoden en het speciale voordeel heeft, wat voor verschillende onderzoekingen op dit gebied van belang is, dat men er in korten tijd een reeks van bepalingen mee kan verrichten.

Zoowel bij de plaatmethode van Koch als de microscopische telmethode van Klein, welke laatste zeker boven de eerste te verkiezen is, ligt het wezen der zaak in het berekenen van het begingetal (a) en het eindgetal (b) der organismen.

Voor de bepaling van den generatieduur nu is de berekening van deze *absolute aantallen* onnoodig. Schrijven we toch de formule $n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$ aldus: $2^n = \frac{b}{a}$, dan zien we dat het voor de berekening van het aantal generaties voldoende is de *verhouding* te kennen tusschen het beginaantal en het eindaantal der organismen. Is het verhoudingsgetal $\frac{b}{a}$ bekend, dan weten we ook de waarde

van n. Bij bekend zijn van T is daaruit gemakkelijk G te berekenen.

Uitgaande van het feit, dat in het verhoudingsgetal van het na zekeren tijd aanwezige aantal organismen, d. i. het eindaantal en het overgeënte aantal d. i. het beginaantal het principieele voor de bepaling van den generatieduur ligt opgesloten, wordt deze redeneering gevolgd :

Stelling. Veronderstel, dat ik van een jonge bouilloncultuur, die een bepaalden graad van troebelheid vertoont, een oogje van bepaalde capaciteit neem en dit ent in een bepaalde hoeveelheid volkomen heldere bouillon (beginaantal = a) en nu den tijd waarneem, waarop deze oorspronkelijk volkomen heldere bouillon precies dezelfde troebelheid bezit (eindaantal = b) als de gebruikte cultuur op het oogenblik, dat daaruit de overenting plaats had, dan bestaat er bij vooropstelling dat de betrokken culturen zich onder volkomen dezelfde voorwaarden ontwikkeld hebben een *bepaalde verhouding* tusschen het begin- en het eindaantal organismen, een verhouding, die afhangt van de capaciteit van het gebruikte oogje en de hoeveelheid bouillon, waarin de overenting plaats vond.

Bewijs. Noem ik het buisje bouilloncultuur, *waaruit* overgeënt wordt : I en het buisje heldere bouillon, waarin de overenting plaats heeft : II, dan bevatten in het aangehaalde geval, wanneer namelijk alle omstandigheden gelijk genomen zijn, I en II evenveel organismen. Ook al is de troebeling van een cultuur niet uitsluitend een gevolg van de aanwezigheid van een aantal bacteriën als zoodanig, maar voor een deel ook van veranderingen door die bacteriën in hun voedingsmedium teweeg gebracht, dan zullen I en II alleen dan volkomen denzelfden graad van troebelheid bezitten, wanneer eenzelfde aantal organismen onder overigens dezelfde omstandigheden deze veranderingen

hebben teweeg gebracht. Bij eenzelfden graad van troebelheid van I en II is het aantal daarin aanwezige organismen precies gelijk.

Neem ik nu van I met een bepaald oogje een aantal organismen en ent dit in II, dan hebben zich, wanneer de troebelheid van II gelijk geworden is aan die van I op het oogenblik, dat daaruit de overenting geschiedde, uit a organismen evenveel maal zooveel bacteriën (b) gevormd als er oogjes gaan in de in buisje II aanwezige hoeveelheid bouillon.

In het aangehaalde geval wordt dus de verhouding $\frac{b}{a}$ bepaald door de verhouding van de in buisje II aanwezige hoeveelheid cultuurvloeistof en de capaciteit van het oogje, waarmee overgeënt werd.

Voor dit speciale geval wordt dus de formule $2^n = \frac{b}{a}$

$$2^n = \frac{\text{hoeveelheid bouillon in II}}{\text{capaciteit van het oogje}}.$$

Heeft nu bijv. het oogje een capaciteit van 1,0 mgr. en bedraagt de hoeveelheid bouillon in II : 5 c. c., d. i. met een zeer kleine afwijking 5000 mgr., dan is

$$2^n = \frac{5000}{1} = 5000 \text{ of } n = \frac{\log\ 5000}{\log\ 2.}.$$

Daaruit is bij bekend zijn van T, G. te berekenen uit de formule $G = \frac{T}{n}$.

Wat nu betreft de practische uitvoering van deze voorop gestelde redeneering zou de eenvoudigste weg de volgende zijn.

Neem uit een licht troebele bouilloncultuur, die gegroeid is bij 37° C. een oogje van bijv. 1,0 mgr. en ent dit in 5 c. c. volkomen helderen bouillon. Fixeer direkt na de overenting de oorspronkelijke cultuur (I). Plaats het geënte

buisje met bouillon (II) bij 37° C. en noteer den tijd (T), die verloopt tot deze bouillon denzelfden graad van troebelheid bezit als de oorspronkelijke cultuur op het oogenblik dat daaruit de overenting plaats vond.

In dat geval is $n = \frac{\log 5000}{\log 2}$.

Aan deze wijze van handelen zijn evenwel drie bezwaren verbonden: 1° is men niet zeker dat bij de fixatie, bijv met formaline, alle organismen direkt gedood worden en loopt men dus de kans dat de troebeling nog eenige verandering ondergaat, 2° wordt de aard der troebeling, wanneer de organismen gedood zijn, eene andere (ook brengt formaline op zichzelf lichte troebeling teweeg in heldere bouillon) en 3° wat het voornaamste bezwaar is, zou men na zekeren tijd telkens de bouillon uit hare omgeving van 37° C. moeten nemen en tijdelijk aan lagere temperatuur moeten blootstellen om na te gaan, of de gewenschte graad van troebelheid nog niet bereikt is. Dit laatste doet natuurlijk zijn invloed gelden op de waarde die men voor den generatieduur krijgt, daar toch bij verschillende temperaturen de vermeerderingssnelheid verandert.

Met hetzelfde bezwaar heeft men te kampen, wanneer men voor vergelijking eene suspensie van een of andere fijn verdeelde in water onoplosbare stof gebruikt en hiermee zoowel I als II laat overeenstemmen.

Na het meegedeelde komt het er dus in hoofdzaak op aan het nadeel te ontwijken, dat verbonden is aan het telkens blootstellen der cultuur aan een andere temperatuur dan waarbij men de bepaling van den generatieduur wil verrichten.

Hieraan nu kan tegemoet gekomen worden door het vervaardigen van niet eén, doch meerdere standaardtroe-

belingen, waarvan de verhoudingen, wat het aantal organismen betreft, bekend zijn en hiermede I en II te vergelijken.

Zoo oppervlakkig beschouwd zou men denken, dat daartoe een groot aantal standaardtroebelingen noodig zijn om elk oogenblik van den voor de bepaling geschikten tijd de vergelijking te kunnen maken. Practisch evenwel is dit niet zoo, en wel op grond van het verschijnsel, dat wanneer men het verloop van een bouilloncultuur van bijv. Bact. coli comm. bij 37° C. vervolgt, in de eerste 3 à 4 uren de bouillon voor het oog volkomen helder blijft, doch daarna, zoodra het eerste spoor van troebeling zich vertoont, binnen korten tijd reeds duidelijke verschillen zijn waar te nemen, zoodat een uur later de bouilloncultuur reeds een vrij belangrijken graad van troebelheid laat zien.

Dit is dan ook de reden, dat, zooals later zal blijken, met deze methode, die dus berust op het met het bloote oog vergelijken van den graad van troebelheid eener cultuur met op bepaalde wijze vervaardigde standaardtroebelingen, zeer nauwkeurige uitkomsten verkregen worden.

Tot staving van het medegedeelde kan nog dienen, dat bij de bepalingen met de microscopische telmethode, zooals ze door Hehewerth zijn verricht en bij eigen proeven met deze methode, waar het eindaantal (b) bepaald werd op een tijdstip, waarop de bouillon licht troebel was geworden de waarden voor n, dat is het aantal generaties, dat plaats gevonden heeft, niet ver uiteen loopen. De waarden voor n bewegen zich namelijk ongeveer tusschen 9 en 14.

Daarbij dient nog in aanmerking te worden genomen, dat het aantal organismen, dat geënt werd, bij verschillende bepalingen zeer uiteen liep, zoodat Hehewerth in het eene geval soms van 8 maal zooveel organismen uitging als in het andere. Waar het eindgetal (b) nu altijd bepaald werd

bij lichte troebeling van den bouillon, kan uit het verschillende aantal dat geënt werd, reeds een verschil van drie generaties (waarvan het achtvoud de uitdrukking is) verklaard worden.

Practisch is nu gebleken, dat vijf standaardtroebelingen zeer voldoende zijn om met nauwkeurigheid generatieduurbepalingen te verrichten.

Wat de vervaardiging dezer troebelingen betreft, kan men weer uitgaan van een door formaline gedoode cultuur, doch hier doen zich ook de straks genoemde bezwaren gelden, dat doode culturen een ander aspect dan levende vertoonen en op den duur de organismen zich tot grootere vlokjes aaneenvoegen, een verschijnsel van aaneenkleving, dat de vergelijking onmogelijk maakt.

Beter is het dan ook chemische stoffen te gebruiken. Na eenig zoeken in de reeks daarvoor in aanmerking komende is het me gebleken, dat talk (magnesiumsilicaat), dat volkomen onoplosbaar is in water en bovendien het voordeel heeft zich niet aan den wand der buisjes vast te hechten, wanneer men het in water verdeelt, een frappante gelijkenis vertoont met een jonge bacteriën cultuur.

De wijze van uitvoering is nu als volgt:

Ongeveer 50 gram talk wordt verdeeld in een cylinder met aqua destillata. Na bezinken der grofste deeltjes wordt de daarboven zich bevindende suspensie afgeheveld en in een tweede cylinder overgebracht. Nadat hieruit weer de grovere deeltjes bezonken zijn, wordt dit proces nog drie à vier maal herhaald. Door deze methode van afslibben verkrijgt men een suspensie van de fijnste deeltjes talk in water. Deze deeltjes zijn zoo fijn, dat circa 6 uren noodig zijn, voordat alles zich op den bodem bevindt. Dit mengsel nu wordt door afnemen of bijvoegen van gedestilleerd water tot zoodanigen graad van troebelheid gebracht, dat 5 druppels van + 50 mgr. hiervan gevoegd bij 5 c. c.

water nog juist een lichte troebeling te zien geven. Thans worden in vijf volkomen heldere reageerbuisjes van gelijken omvang en dezelfde soort glas verschillende hoeveelheden van genoemd mengsel gedaan, hoeveelheden, waarvan de verhouding zoodanig gekozen is, dat met het bloote oog verschil in de troebelingen onderling zichtbaar is en bovendien de sterkste troebeling niet die van een bouilloncultuur van Bact. coli comm. gedurende 6 uren bij 37° C. gegroeid, overtreft. In dit laatste geval is men zeker, dat nog niet, bij overeenstemming met genoemde standaardtroebeling, het door Hehewerth op den voorgrond geplaatste maximum van aantal bereikt is, zoodat voor Bact. coli comm., gekweekt in bouillon en gegroeid bij 37° C., bij overeenstemming daarmee, de bepaling van den generatieduur nog verricht mag worden.

Als zeer bruikbare verhoudingsgetallen der hoeveelheden van de genoemde talksuspensie tot vervaardiging der standaardtroebelingen, die onderscheiden worden door de letters A, B, C, D en E hebben zich de volgende doen kennen, A : 5, B : 8, C : 14, D : 23, en E : 35. Dat in deze een opklimmende reeks gevolgd wordt, vindt hierin zijn oorzaak, dat, werd dit niet gedaan en nam men het verschil in aantal deeltjes tusschen D en E evengroot als tusschen A en B, de verschillen voor de sterkere graden van troebelheid, welke D en E representeeren, onduidelijk zijn. Wel werden in den loop der onderzoekingen af en toe andere verhoudingen genomen als de genoemde, hetgeen vermeld moet worden met het oog op de eenigszins andere waarden voor n in het volgende hoofdstuk, doch dit doet niets tot het wezen der zaak af.

Nadat dus in A : 5, in B : 8, in C : 14, in D : 23 en in E : 35 druppels van het talkmengsel gedaan zijn, waarbij later toevoeging van een druppel glycerine en wat sublimaat-

solutie van voordeel gebleken is voor een langdurig goed houden der standaardtroebelingen, worden deze hoeveelheden zoover met water aangevuld tot ieder der buisjes juist 5 c c vloeistof bevat en daarna luchtdicht afgesloten.

Thans overgaande tot het gebruik dezer vijf standaardtroebelingen voor de bepaling van den generatieduur nemen we als eerste veronderstelling aan, dat de cultuur, waaruit geënt wordt (I) overeenkomt met troebeling A en na zekeren tijd de cultuur, welke geënt werd (II) ook met A; dan hebben we het in het begin van dit hoofdstuk aangehaalde geval. Aangenomen, dat het oogje een capaciteit heeft van 1 mgr en II 5 c c bouillon bevat, is de waarde voor het aantal generaties: $n = \frac{\log 5000}{\log 2}$.

Komt in een ander geval I overeen met A, doch II met *B* dan hebben zich uit I $^8/_5$ maal zooveel organismen gevormd als wanneer II overeenkomt met A.

De formule $2^n = \frac{b}{a}$ wordt voor dit geval $2^n = \frac{^8/_5 \times b}{a}$ $= \frac{^8/_5 \times 5000}{1} = 8000$ en $n = \frac{\log 8000}{\log 2}$.

Past in een derde veronderstelling I bij *B* en II bij A, dan is het aantal *overgeënte* organismen $^8/_5$ maal zoo groot als wanneer I overeenkomt met A en wordt de formule $2^n = \frac{b}{^8/_5 \times a} = \frac{5000}{^8/_5 \times 1} = 3125$. In dit geval is $n = \frac{\log 3125}{\log 2}$.

Waar I behoort bij B en II eveneens bij B is wederom $n = \frac{\log 5000}{\log 2}$.

Zoo verder gaande zijn dus de waarden voor *n* bij al de mogelijke combinaties te berekenen en hiervan geeft bijgevoegde tabel een overzicht.

Aangezien de capaciteit van het oogje niet 1,0 doch 1,1 mgr. bedraagt, is de verhouding $\frac{b}{a}$ niet $\frac{5000}{1} = 5000$ doch $\frac{5000}{1,1} = 4545$, zoodat bij de eerstgenoemde veronderstelling n wordt $\frac{\log 4545}{\log 2}$.

Na het medegedeelde behoeft de schrijfwijze I A en II A enz. geen nadere verklaring.

Tabel der waarden van de aantallen plaats gevonden generaties (n) bij overeenstemming der culturen I en II met de standaardtroebelingen A, B, C, D en E, waarvan de verhoudingsgetallen zijn: 5, 8, 14, 23 en 35.

I A en II A	$2^n = \frac{5/5 \times b}{a} = 5/5 \times 4545 = 4545$	$n = 12,15$
I A en II B	$2^n = \frac{8/5 \times b}{a} = 8/5 \times 4545 = 7272$	$n = 12,83$
I A en II C	$2^n = \frac{14/5 \times b}{a} = 14/5 \times 4545 = 12726$	$n = 13,63$
I A en II D	$2^n = \frac{23/5 \times b}{a} = 23/5 \times 4545 = 20907$	$n = 14,35$
I A en II E	$2^n = \frac{35/5 \times b}{a} = 35/5 \times 4545 = 31815$	$n = 14,96$
I B en II A	$2^n = \frac{b}{8/5 \times a} = 5/8 \times 4545 = 2840$	$n = 11,44$
I B en II B	$2^n = \frac{b}{8/8 \times a} = 8/8 \times 4545 = 4545$	$n = 12,15$
I B en II C	$2^n = \frac{14/8 \times b}{a} = 14/8 \times 4545 = 7952$	$n = 12,96$
I B en II D	$2^n = \frac{23/8 \times b}{a} = 23/8 \times 4545 = 13064$	$n = 13,67$
I B en II E	$2^n = \frac{35/8 \times b}{a} = 35/8 \times 4545 = 19880$	$n = 14,28$

I C en II A	$2^n = \frac{b}{{}^{14}/_{5} \times a} = {}^{5}/_{14} \times 4545 = 1623$	$n = 10{,}66$
I C en II B	$2^n = \frac{b}{{}^{14}/_{8} \times a} = {}^{8}/_{14} \times 4545 = 2597$	$n = 11{,}34$
I C en II C	$2^n = \frac{b}{{}^{14}/_{14} \times a} = {}^{14}/_{14} \times 4545 = 4545$	$n = 12{,}15$
I C en II D	$2^n = \frac{{}^{23}/_{14} \times b}{a} = {}^{23}/_{14} \times 4545 = 7466$	$n = 12{,}86$
I C en II E	$2^n = \frac{{}^{35}/_{14} \times b}{a} = {}^{35}/_{14} \times 4545 = 11361$	$n = 13{,}47$
I D en II A	$2^n = \frac{b}{{}^{23}/_{5} \times a} = {}^{5}/_{23} \times 4545 = 988$	$n = 9{,}95$
I D en II B	$2^n = \frac{b}{{}^{23}/_{8} \times a} = {}^{8}/_{23} \times 4545 = 1581$	$n = 10{,}63$
I D en II C	$2^n = \frac{b}{{}^{23}/_{14} \times a} = {}^{14}/_{23} \times 4545 = 2766$	$n = 11{,}43$
I D en II D	$2^n = \frac{b}{{}^{23}/_{23} \times a} = {}^{23}/_{23} \times 4545 = 4545$	$n = 12{,}15$
I D en II E	$2^n = \frac{{}^{35}/_{23} \times b}{a} = {}^{35}/_{23} \times 4545 = 6916$	$n = 12{,}75$
I E en II A	$2^n = \frac{b}{{}^{35}/_{5} \times a} = {}^{5}/_{35} \times 4545 = 650$	$n = 9{,}34$
I E en II B	$2^n = \frac{b}{{}^{35}/_{8} \times a} = {}^{8}/_{35} \times 4545 = 1039$	$n = 10{,}02$
I E en II C	$2^n = \frac{b}{{}^{35}/_{14} \times a} = {}^{14}/_{35} \times 4545 = 1819$	$n = 10{,}83$
I E en II D	$2^n = \frac{b}{{}^{35}/_{23} \times a} = {}^{23}/_{35} \times 4545 = 2988$	$n = 11{,}54$
I E en II E	$2^n = \frac{b}{{}^{35}/_{35} \times a} = {}^{35}/_{35} \times 4545 = 4545$	$n = 12{,}15$

De waarden voor n bewegen zich in deze tabel tusschen *9,34* en *14,96*. Dat de standaardtroebelingen met de hiervoor gekozen verhoudingsgetallen 5, 8, 14, 23 en 35 voor de generatieduurbepalingen voldoen blijkt zoowel uit door Hehewerth genomen proeven als eigen waarnemingen met de microscopische telmethode gedaan.

Bij eigen proeven toch varieerden de waarden van 9,86 tot 14,48. Enkele malen bepaalde Hehewerth den generatieduur nadat een kleiner aantal generaties dan 9,34 had

plaats gevonden. Het is niet geoorloofd hiervoor het feit aansprakelijk te stellen, dat H. Bact. coli comm. uit 18—24 uur oude culturen overentte, terwijl bij de hier volgende bepalingen dit geschiedde uit culturen, jonger dan 6 uren (dit laatste is een vereischte, daar de cultuur, waaruit overgeënt wordt, in troebelheid overeen moet komen met een der standaardtroebelingen). Waar toch uit door H. genomen proeven bleek, dat in 6 uren een maximum van aantal bereikt wordt en van af 6 tot 24 uren een stilstand in de vermeerdering optreedt (horizontale lijn der curve), levert dus het na 6 en na 24 uren aanwezige aantal organismen geen noemenswaardig verschil op. Dat af en toe de bepaling door H. bij een kleiner aantal generaties verricht kon worden hangt vermoedelijk hiermee samen, dat het gebruikte oogje een grootere capaciteit bezat, zoodat een kleiner aantal generaties behoeft plaats te vinden totdat een lichte troebeling optreedt.

Daar door mij zeer jonge culturen (— 6 uren) voor de overenting gebruikt worden is hieraan nog het voordeel verbonden, dat de periode van rust een nog kleinere stoornis bij de bepalingen veroorzaakt dan wanneer men uitgaat van 18—24 uur oude culturen.

Zooals gezegd geven de standaardtroebelingen met de verhoudingsgetallen 5, 8, 14, 23 en 35 voor het oog duidelijke verschillen te zien. Mocht het nu toch nog een enkele keer voorkomen, dat bij de beoordeeling van een bepaalde bacteriëntroebeling een vergissing werd begaan, dan levert dit voor de waarde van den generatieduur maar een kleine fout op. Veronderstel bijvoorbeeld, dat II in werkelijkheid overeenkomt met C en verkeerdelijk wordt aangenomen dat D de juiste troebeling is, dan krijgt men. als I past bij B, voor n een waarde van *13,67* terwijl deze in werkelijkheid bedraagt *12,96*.

Is hiervoor nu een tijdsverloop van 300 minuten noodig geweest, dan is de foutieve waarde voor G:

$$G = \frac{T}{n'} = \frac{300}{13{,}67} = 21'57'',$$

de ware daarentegen:

$$G = \frac{T}{n} = \frac{300}{12{,}96} = 23'9'',$$

hetwelk een verschil van ruim één minuut of een fout van 4% geeft. Wordt nog ongunstiger geval genomen en gaat men ook I verkeerd beoordeelen en dit wel in de andere richting, dan is de fout nog kleiner dan 10%, zoodat te voren reeds gezegd kan worden, dat deze wijze om den generatieduur te bepalen goede uitkomsten moet opleveren. Het zal toch moeilijk zijn erger vergissingen te begaan. Uit het meegedeelde volgt ook nog, dat wanneer een cultuurtroebeling tusschen twee standaardtroebelingen inligt, het van zeer weinig invloed op de uitkomst zal wezen of men naar de eene of naar de andere zijde overhelt.

Alvorens over te gaan tot de mededeeling der verkregen uitkomsten tot slot nog ééne opmerking. De vraag schijnt me namelijk gerechtvaardigd, of men bij de generatieduurbepalingen geen fout zal begaan in die richting, dat men aanneemt, waar bijv. troebeling E zeven maal zooveel deeltjes der talksuspensie bevat als troebeling A, eene bouilloncultuur overeenkomende met E ook zeven maal zooveel organismen bevat als eene, die bij A past. Het is toch bekend, dat de troebeling van een cultuur behalve van de aanwezigheid van organismen als zoodanig, voor een deel ook afhangt van omzettingen door die organismen in de voedingsvloeistof teweeg gebracht. Een direkt bewijs hiervoor levert het verschijnsel, dat terwijl, zooals reeds eerder werd opgemerkt, van Bact. coli comm. gekweekt in bouillon en gegroeid bij 37° C. het aantal van

6 tot 24 uren geen noemenswaardige vermeerdering ondergaat, de troebeling van de cultuur gedurende dien tijd wel aanmerkelijk toeneemt. Daarbij weten we, dat hoe ouder de cultuur wordt, hoe meer troebeling ontstaat, die niet van de aanwezigheid der organismen als zoodanig afhankelijk is. Zeer goed zou dus een cultuur, overeenkomende met E, welke ouder is dan eene, die bij A past in werkelijkheid minder dan zeven maal zooveel organismen als deze kunnen bevatten.

De mogelijkheid mag niet ontkend worden, doch men bedenke, dat ook de culturen overeenkomende met standaardtroebeling E nog zeer jong zijn en in leeftijd niet zooveel verschillen van die waarbij A in 't spel is. Bovendien is behalve nog door met de microscopische telmethode vergelijkingen te maken de controle hierop te vinden in de bepalingen zelf met mijn methode verricht. Doet het bezwaar zich voor, dan zullen alle bepalingen, waarbij troebeling E betrokken is, voor I en II natuurlijk in tegengestelden zin, andere uitkomsten moeten opleveren dan wanneer troebeling A aangehaald wordt en bovendien zal dit, wat het voornaamste is, bij alle waarnemingen in ééne richting moeten plaats hebben.

In het kort zijn nu voor de uitvoering der bepalingen noodig :

1° buisjes van denzelfden omvang en dezelfde soort glas met 5 c c volkomen heldere bouillon gevuld.

2° een geijkt oogje, waarvan de capaciteit bepaald wordt door de gemiddelde waarde te nemen van de hoeveelheid vloeistof, die 50 van deze oogjes bevatten en deze hoeveelheid door weging vast te stellen.

3° vijf standaardtroebelingen A, B, C, D en E, vervaardigd

door in vijf buisjes van gelijken omvang en dezelfde soort glas een aantal druppels van een suspensie van de fijnste deeltjes talk in water te doen van zoodanige concentratie, dat vijf druppels gevoegd bij 5 c c vloeistof nog juist voor het oog een lichte troebeling vertoonen, deze buisjes aan te vullen met water tot de hoeveelheid van ieder 5 c c bedraagt, waarbij de verhouding van de aantallen deeltjes talk zijn uitdrukking vindt in de getallen 5, 8, 14, 23 en 35.

Waar enkele malen standaardtroebelingen met andere verhoudingsgetallen werden gebruikt, verschilden deze weinig van de genoemde. Hiervoor zijn natuurlijk andere tabellen der waarden van n noodig, die om te groote uitvoerigheid te vermijden niet medegedeeld worden.

4° een gewone lamp om de bepalingen bij steeds dezelfde verlichting te doen plaats vinden.

DERDE HOOFDSTUK.

BEPALINGEN VAN DEN GENERATIEDUUR MET DE IN HOOFDSTUK II BESCHREVEN METHODE.

Alvorens over te gaan tot de mededeeling der verkregen uitkomsten zij met een enkel woord een gevaarlijke neiging gememoreerd, die vooral op het gebied der bacteriologie den laborant parten kan spelen. Dat is het *willen verkrijgen* van een bepaald resultaat, hetwelk naar aanleiding van theoretische overwegingen als anderszins van te voren verwacht werd. Vaak onbewust is deze autosuggestie natuurlijk een bron van fouten. Om nu deze klip te omzeilen heb ik zooveel mogelijk tegelijkertijd van elkaar geheel verschillende bepalingen gedaan, waardoor de kans onbewust de uitkomsten te flatteeren minimaal werd. Bij de hier volgende bepalingen was bovendien dit gevaar zoo groot niet, daar de onderlinge verschillen der standaardtroebelingen voor het oog zeer duidelijk zijn. Uit de tabellen blijkt, dat een enkele maal een bacteriëntroebeling het midden hield tusschen twee standaardtroebelingen, hetgeen met zekerheid kon waargenomen worden. De schrijfwijzen CD en DE enz. zijn daarvan de uitdrukking.

De organismen, waarvan ik generatieduurbepalingen gedaan heb, zijn: Bact. coli commune (3 stammen), Bac. typhi (2 stammen); Bac. pyocyaneus (3 stammen), Vibrio cholerae, Vibrio Dunbar, Staphylococcus pyogenes albus en Bac. diphtheriae. Ze zijn uitsluitend gekweekt in Löfflerschen bouillon, op de gewone wijze bereid en volkomen neutraal ten opzichte van blauw lakmoespapier. Dit laatste verdient volgens Heim de voorkeur boven

rood lakmoespapier en is voor een juiste beoordeeling zeer geschikt. Om eventueele veranderingen in den bouillon te voorkomen werden telkenmale niet meer dan vijftig buisjes tegelijk ieder met 5 c c hiervan gevuld en werd steeds de reactie gecontroleerd.

De verschillende organismen waren tevoren enkele malen in dezen bouillon overgeënt, aangezien uit de waarnemingen van Hehewerth gebleken is, dat hierna de generatieduur een korter tijdsverloop bedraagt dan wanneer ze direkt van een anderen, vooral vasten, voedingsbodem in bouillon worden overgebracht. De organismen hebben dus een zekeren tijd noodig om zich aan hun nieuw voedingsmedium te gewennen.

Ten einde bij de verschillende proeven de organismen zoo mogelijk direct aan een temperatuur bloot te stellen, waarbij men de generatieduurbepaling wil verrichten, plaatste ik de culturen in water, dat in de broedstoof op de gewenschte temperatuur gebracht was.

---

1. Allereerst zijn nu bepalingen gedaan met een stam van Bact. coli commune, sinds jaren in het Hygiënisch Laboratorium aanwezig, zoowel bij verschillende temperaturen voor de cultuur waaruit de overenting geschiedde als de cultuur waarmee de bepaling verricht werd. Van de uitkomsten geven de eerste zeven tabellen een overzicht.

TABEL I.

Bact. coli comm. gegroeid bij *36—37° C.*
De cultuur, waaruit *1 oogje = 1,1 mgr.* werd overgeënt, was gegroeid bij *37° C.*

Volgnummer.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	I D en II B	10,98	235 min.	21′ 24″
2	I A en II A	12,15	260 min	21′ 23″
3	I C en II A	10,77	230 min.	21′ 20″
4	I E en II A	9,56	230 min.	24′ 4″
5	I C en II B	11,45	235 min.	20′ 31″
6	I DE en II C	11,06	230 min.	20′ 47″

Tabel II.

Bact. coli comm. gegroeid bij *36—37° C.*

De cultuur, waaruit *1 oogje = 1,1 mgr.* werd overgeënt, was gegroeid bij *22° C.*

Volgnummer.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	I D en II D	12,15	260 min.	21′ 23″
2	I D en II B	10,98	260 min.	22′ 10″
3	I A en II B	12,83	310 min.	24′ 10″
4	I A en II C	13,53	295 min.	21′ 48″
5	I A en II E	14,73	305 min.	20′ 42″
6	I A en II E	15,15	325 min.	21′ 27″
7	I A en II C	13,73	315 min.	22′ 55″
8	I A en II B	12,99	290 min.	22′ 19″
9	I A en II B	12,99	295 min.	22′ 43″
10	I C en II E	13,55	280 min.	20′ 40″
11	I E en II E	12,15	290 min.	23′ 52″
12	I C en II B	11 23	250 min.	22′ 16″
13	I C en II CD	12,53	290 min.	23′ 8″

Tabel III.

Bact. coli comm. gegroeid bij *22—23° C.*

De cultuur, waaruit *1 oogje = 1,1 mgr.* werd overgeënt, was gegroeid bij 18° C, 22° C, 37° C of 40° C.

Volg-nummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	37° C.	I C en II A	10,56	1105 min.	104′
2	37° C.	I D en II A	9,89	1115 min.	113′
3	37° C.	I D en II A	9 89	1075 min.	107′
4	37° C.	I B en II A	11,30	1125 min.	99′
5	40° C.	I B en II CD	13.22	1215 min.	92′
6	22° C.	I CD en II C	11,76	1310 min.	111′
7	22° C.	I E en II E	12,15	1430 min.	117′
8	22° C.	I D en II CD	11,76	1355 min.	115′
9	18° C.	I C en II C	12,15	1285 min.	106′
10	40° C.	I DE en II C	11,06	1160 min.	105′
11	37° C.	I CD en II DE	12,85	1350 min.	105′

Tabel IV.

Bact. coli comm. gegroeid bij *18°—19° C.*

De cultuur, waaruit *1 oogje = 1,1 mgr.* werd overgeënt, was gegroeid bij *37° C.*

Volgnummer.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	I CD en II AB	10,60	1730 min.	162′
2	I E en II C	10,74	1575 min.	147′

Tabel V.

Bact. coli comm. gegroeid bij *36—37° C.*

De cultuur, waaruit *1 oogje = 1.1 mgr.* werd overgeënt, was te voren gedurende *16 uren* aan een temperatuur van *7° C.* blootgesteld.

Volgnummer.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	I C en II A	10,77	260 min.	24′ 6″
2	I A en II D	13,99	360 min.	25′ 44″
3	I B en II C	12,85	300 min.	23′ 21″
4	I D en II D	12,15	305 min.	25′ 6″
5	I D en II C	11,47	295 min.	25′ 42″
6	I C en II C	12,15	265 min.	21′ 49″
7	I C en II B	11,23	285 min.	25′ 23″
8	I D en II DE	12,46	295 min.	23′ 41″

Tabel VI.

Bact. coli comm. gegroeid bij *39—40° C.*

De cultuur, waaruit een *1 oogje = 1,1 mgr.* werd overgeënt, was gegroeid bij *22° C.* of *40° C.*

Volg-nummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	40° C.	I E en II B	9,99	195 min.	19′ 31″
2	22° C.	I A en II D	14,41	270 min.	18′ 46″
3	22° C.	I C en II E	13,55	260 min.	19′ 11″
4	22° C.	I E en II E	12,15	245 min.	20′ 19″
5	40° C.	I C en II CD	12,53	230 min.	18′ 22″
6	22° C.	I DE en II D	11,82	210 min.	17′ 46″
7	40° C.	I A en II E	15,15	290 min.	19′ 8″
8	22° C.	I C en II E	13,15	285 min.	21′ 2″

TABEL VII.

Bact. coli comm. gegroeid bij *39—40° C.*

De cultuur, waaruit *1 oogje = 1,1 mgr.* werd overgeënt, was te voren gedurende *16 uren* aan een temperatuur van *7° C.* blootgesteld.

Volgnummer.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	I CD en II DE	12,92	260 min.	20′ 7″
2	I D en II DE	12,46	270 min.	21′ 41″
3	I C en II BC	11,69	240 min.	20′ 32″
4	I D en II B	10,73	260 min.	24′ 28″

In tabel I hebben zoowel de culturen, waaruit de overentingen plaats vonden (I) als de culturen, welke geënt werden om den generatieduur te bepalen (II), zich onder volkomen dezelfde voorwaarden ontwikkeld. Zoowel de voedingsbouillon als de temperatuur van 36—37° C waren voor beiden gelijk. In de zes waarnemingen zien we de waarden uiteenloopen van 20′ 31″ tot 24′ 4″, hetgeen een verschil geeft van $3\frac{1}{2}$ minuut. Ook tabel II, waar de cultuur, welke voor de overenting diende, gegroeid is bij 22° C vertoont slechts kleine onderlinge verschillen. In 13 bepalingen bewegen de uitersten zich toch tusschen 20′ 40″ en 24′ 10″, eveneens een verschil van $3\frac{1}{2}$ minuut opleverende.

In hoofdzaak zijn deze schommelingen wel afhankelijk van kleine verschillen in de voedingsvloeistof en de aantallen organismen welke met het geijkte oogje worden overgeënt. De gemiddelde waarde van tabel II: 22′ 16″ is nog geen minuut grooter dan die van tabel I: 21′ 35″.

Voor dit kleine verschil moet wel het tijdperk van niet vermeerdering aansprakelijk gesteld worden, dat de organismen, die bij 22° C gegroeid zijn, noodig hebben om zich te accommodeeren aan een temperatuur van 36—37° C.

Wanneer we nu de uitkomsten in deze twee tabellen vergelijken met de waarden, welke Hehewerth voor denzelfden bacil onder dezelfde omstandigheden met de microscopische telmethode verkreeg, dan zien we dat deze vrijwel overeenstemmen. Zijn uitkomsten bewegen zich in vijf bepalingen tusschen 21′ 18″ en 26′ 45″ d. i. een verschil van $5\frac{1}{2}$ minuut.

Tevens ligt het gemiddelde van zijn waarnemingen: 23′ 34″ 2 minuten hooger dan het hierboven vermelde gemiddelde.

Dit vindt, iets wat trouwens H. zelf reeds vermoedde, zijn oorzaak in het feit, dat door hem voor de overenting 18-24 uur oude culturen gebruikt werden en dus het tijdperk van rust zoo al geen grooten dan toch eenigen invloed op de uitkomsten heeft, terwijl bij de bepalingen met mijne methode die culturen niet ouder dan 4 à 5 uren zijn en zich dus in een periode bevinden, waarin nog bepalingen verricht mogen worden.

Aangezien dit tijdperk van rust later nogal eens ter sprake zal komen wensch ik thans een beschouwing hierover te laten voorafgaan en stel me de vraag: *wat is het tijdperk van niet vermeerdering na de overenting.*

Antwoord:

1° de tijd, die de organismen noodig hebben om de *shock* te boven te komen, die ze door hun overbrenging in een ander milieu ondervinden alvorens tot vermenigvuldiging over te gaan.

2° de tijd, die ze behoeven om zich te herstellen van de meer ongunstige omstandigheden, waaronder ze in het zoo juist verlaten cultuurmedium verkeerden alvorens zich te gaan deelen in hun nieuw milieu, waarin deze ongunstige voorwaarden niet aanwezig zijn en mogelijk ook nog de tijd, welke de vertraging in de vermenigvuldiging der eerste generaties in vergelijking met de volgende aangeeft.

Terwijl de shock als algemeen biologisch verschijnsel een nadere bespreking overbodig maakt zal ik me bij punt 2 bepalen en ga daarbij uit van de door Max Müller opgedane ervaring (te voren geciteerd), dat hoe *ouder de cultuur* des te *grooter het tijdperk van rust* na de overenting is.

In een oude bouilloncultuur bevinden zich vele organismen en deze hebben gedurende langeren of korteren tijd veranderingen in de bouillon teweeg gebracht en daarin stoffen geproduceerd noodlottig voor hun eigen voortbestaan.

Vandaar dan ook, dat in een oudere cultuur steeds afgestorven organismen aanwezig zijn. Zoo bevinden zich in een 24 uur oude bouilloncultuur van vibrio cholerae slechts 30 % levende organismen en is dit getal na 71 uren tot 3 % gedaald, zooals door Hehewerth is geconstateerd.

Aangezien nu de productie van giftige bestanddeelen geleidelijk geschiedt zal een organisme, eerst goed in staat zich te vermenigvuldigen, alvorens het afgestorven is een tijdperk doormaken, waarin een harer levensuitingen, de deeling, nog wel plaats heeft doch veel langzamer geschiedt.

Wordt nu een zoodanig organisme plotseling bij de overenting onder veel gunstiger verhoudingen gebracht, dan doen zich twee mogelijkheden voor; òf het was te ver heen om het aldus van een wissen dood te redden en dan is het verder buiten beschouwing, òf het blijft in leven. Wat nu het verdere lot van dit kleinste wezen aangaat, zoo zijn weer twee dingen mogelijk en wel primo kan een volkomen restitutio ad integrim plaats vinden en secundo kan dit niet het geval zijn. Voor deze laatste mogelijkheid blijft de vraag bestaan of, terwijl

dit organisme als voor de vermenigvuldiging minderwaardig individu toch in staat is zich te deelen, het tweede, derde enz. geslacht nog iets van de rampspoeden van hun voorvader zullen bemerken.

Ten aanzien van den generatieduur kan men met *neen* antwoorden, want ent men uit een bouilloncultuur, waarin dit organisme oorspronkelijk was ingebracht, dan geschiedt de vermeerdering even snel en is de generatieduur dezelfde als wanneer zoodanig precedent zich niet had voorgedaan.

Treedt nu volkomen restitutio ad integrim op, dan is hiertoe evenzeer tijd noodig als het tijd kostte het oorspronkelijk volkomen flinke organisme tot afsterving te brengen.

Deze tot herstel benoodigde tijd nu is uitgedrukt in het tijdperk van rust na de overenting. Voor Bac. typhosus vond Max Müller dat het bij overenting uit 16 uur oude culturen één uur en meer kan bedragen.

Aangezien zooals later zal blijken de generatieduur van dit organisme bij 37° C. 30 minuten bedraagt, levert dit een vertraging van twee generaties op, hetgeen natuurlijk van beteekenis is. Müller zegt tevens: is de cultuur zeer jong, dan is het tijdperk van rust slechts kort. Ik zou verder willen gaan en zeggen: is de cultuur waaruit de overenting geschiedt slechts enkele uren oud, dan is het tijdperk van rust voor zoover dit punt 2 betreft practisch nihil, d. w. z. zijn invloed beweegt zich binnen de fout der methode. Was dit niet zoo, dan zouden toch bij de generatieduurbepalingen met mijn methode, waar noodwendig de cultuur voor de overenting gebruikt zeer jong moet zijn, aangezien hare troebelheid niet die van een bouilloncultuur mag overschrijden, waarbij de generatieduurbepaling nog verricht mag worden en dus van een

afsterving en zelfs verlangzaamde vermenigvuldiging geen sprake kan wezen, de bepalingen, waarbij I overeenkomt met standaardtroebeling A, in welke cultuur dus minder ongunstige verhoudingen aanwezig zijn dan in eene, welke overeenstemt met bijv. troebeling D, waar meer organismen hun werking in de bouillon hebben ontvouwd, alle een kleinere waarde voor den generatieduur moeten opleveren dan in het laatste geval. Zooals tabel I en II doen zien is dit geenszins zoo en derhalve is het tijdperk van rust uitgezonderd het aandeel dat de shock heeft bij deze bepalingen practisch nihil. De hier verkregen uitkomsten zijn tevens dichter bij de waarheid; de eenigszins hoogere waarden van Hehewerth moeten op rekening van het tijdperk van rust geschreven worden.

Tabel III laat zien, dat bij 22° C. Bact. coli comm. in bouillon zich 5 maal zoo langzaam vermeerdert als bij 37° C. Onderling loopen de waarden veel meer uiteen; de uiterste verschillen ± 20 minuten. Dit is zeer verklaarbaar, daar de tijd om een gelijk aantal generaties te doen plaats hebben 5 à 6 maal zoo groot is als bij 37° C. In de formule $G = \frac{T}{n}$ wordt dus de fout met de methode gemaakt naar evenredigheid vergroot. In vergelijking met tabel I en II moeten de uiterste verschillen ook 5 à 6 maal $3^1/_2$ minuut = ± 20 minuten bedragen. Welke methode men ook volgt, steeds zullen deze verschillen zich doen gelden. Hehewerth vond onder dezelfde omstandigheden waarden van ± 80′. Aangezien hij hiervoor een methode gebruikte die wat nauwkeurigheid betreft achterstaat bij de oorspronkelijk door hem gevolgde en hij slechts twee bepalingen deed, mag hieraan geen beteekenis toegekend worden.

De enkele bepalingen in tabel IV wijzen op een duide-

lijke verlenging van den generatieduur bij een verschil van 4° C. in de richting van het nulpunt.

Om den invloed van een lagere temperatuur op Bact. coli comm. na te gaan werden bij de bepalingen in tabel V de organismen vóór de overenting gedurende 16 uren aan een temperatuur van 7° C. blootgesteld. Noemenswaardige vermeerdering van troebeling neeft niet plaats in dien tijd, maar wel blijkt deze temperatuur ongunstig voor de ontwikkeling van Bact. coli comm. te zijn. Onderling leveren de uitkomsten weer slechts kleine verschillen op. De gemiddelde waarde van 24′ 54″ geeft in vergelijking met tabel I een schijnbare verlenging van ruim 3 minuten voor den generatieduur te zien. Dit wil zeggen dat òf enkele organismen onder den voorafgaanden invloed van een temperatuur van 7° C. reeds afgestorven zijn òf het tijdperk van rust hier beteekenis verkrijgt en dus de organismen eenigen tijd noodig hebben alvorens zich te gaan deelen.

Een temperatuur van 7° C. oefent een nadeeligen invloed op het organisme uit.

Aangemoedigd nu door de gunstige resultaten met deze methode tot dusverre verkregen, kwam het me belangrijk voor na te gaan welken invloed *koortstemperaturen* (40° C.) in vergelijking met de normale lichaamstemperatuur (37° C) op de ontwikkeling van dit pathogene organisme in vitro uitoefenen, door te zien, of er verschil in groei onder overigens gelijke omstandigheden bij een temperatuur van 37° C. en 40° C. bestaat.

In deze richting zijn door Max Müller proeven genomen met Bac. typhosus, evenwel zonder resultaat. Dit kan geen verbazing wekken als men bedenkt, dat de plaatmethode, welke voor dat doel door hem gebruikt werd, een zeer groote fout oplevert en deze methode dus in kleine verschillen geen juist oordeel toelaat.

In tegenstelling nu met wat ik verwachtte, daar toch voor de meeste pathogene organismen een optimum temperatuur van 37° C. aangenomen wordt, bleek het me, zooals tabel VI doet zien, dat Bact. coli comm. *beter* gedijt bij een temperatuur van 39—40° C. In vergelijking toch met tabel I en II, waar de omstandigheden overigens volkomen dezelfde zijn en de gemiddelde generatieduur 22′ 16″ bedraagt is hier de generatieduur ruim $2^1/_2$ minuut kleiner; de gemiddelde waarde bedraagt namelijk 19′ 36″. Om nu deze gunstige verhouding bij een temperatuur van 39—40° C. na te gaan behoeft men niet eens generatieduurbepalingen te verrichten. Ent men toch met hetzelfde oogje uit dezelfde cultuur twee volkomen gelijke buisjes, ieder gevuld met 5 c c van denzelfden bouillon, plaatst men daarna het eene buisje bij 36—37° C., het andere bij 39—40° C. en wacht men nu het tijdstip af waarop deze culturen een lichte troebeling vertoonen, dan is de cultuur bij 39—40° C. op hetzelfde oogenblik troebeler dan de cultuur bij 36—37° C. en dit gaat bij alle proeven constant op.

Nu kan men mij direct tegenvoeren: wie geeft u het recht aan te nemen, dat al is de troebeling in een cultuur bij 39—40° C. grooter op een gegeven oogenblik dan bij 36—37° C., eerstgenoemde cultuur ook meer organismen moet bevatten dan de laatste en waarom zou de troebeling in een cultuur, bij 39—40° C. gegroeid, niet van quantitatief en qualitatief andere omzettingen in den bouillon afhankelijk kunnen zijn. Volkomen juist, maar dan moet daar ook direkt uit volgen, dat wanneer men den cultuur van 39—40° C. gebruikt als cultuur I voor de bepaling van den generatieduur, bij meerdere proeven de gevonden waarden steeds hooger moeten uitvallen dan wanneer men daartoe culturen van 36—37° C. aanwendt. Dit nu blijkt

noch in deze tabellen noch in andere tabellen, die volgen, het geval te zijn en ook zullen later vergelijkingen met de microscopische telmethode geenszins hierop wijzen.

Een koortstemperatuur van *39—40° C. werkt de vermeerdering van Bact. coli comm. in bouillon in de hand tegenover de normale lichaamstemperatuur.*

Evenals bij 36—37° C. wijst bij 39—40° C. het blootstellen van cultuur I vóór de overenting gedurende 16 uren aan een temperatuur van 7° C. op een schijnbare verlenging van den generatieduur. Uit tabel VII is ook tevens de snellere vermeerdering bij 39—40° C. te zien.

---

2. Na aldus den groei van Bact. coli comm. in lakmoesblauw neutralen voedingsbouillon bij verschillende temperaturen te hebben nagegaan kwam het me belangrijk voor ook van andere stammen van dit organisme de vermeerderingssnelheid te bepalen onder overigens dezelfde omstandigheden en ontving ik door de vriendelijke bemiddeling van Dr. Broers in Utrecht twee stammen van verschillende herkomst.

De eerste was een jaar te voren uit normale faeces gekweekt en hiervan werden voor den generatieduur de volgende waarden gevonden.

Tabel VIII.

Bact. coli comm. (Utrecht: uit faeces) gegroeid bij *36—37° C.*

De cultuur, waaruit *1 oogje = 1,1 mgr.*
werd overgeënt, was gegroeid bij 22° C., 37° C. of 40° C.

Volgnummer.	Temperatuur, waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	37° C.	I C en II BC	11,74	225 min.	19′ 10″
2	„	I AB en II A	11,79	240 min.	20′ 21″
3	22° C.	I E en II CD	11,18	220 min.	19′ 41″
4	37° C.	I CD en II C	11,79	235 min.	19′ 56″
5	40° C	I DE en II CD	11,48	220 min.	19′ 10″

TABEL IX.

Bact. coli comm. (Utrecht: uit faeces) gegroeid bij *39—40° C.*

Cultuur I was gegroeid bij 22° C., 37° C. of 40° C.

Volg-nummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	37° C.	I C en II D	12,86	225 min.	17′ 29″
2	37° C.	I AB en II CD	13,65	240 min.	17′ 35″
3	22° C.	I E en II DE	11,84	220 min.	18′ 35″
4	37° C.	I CD en II DE	12,80	235 min.	18′ 22″
5	40° C.	I DE en II DE	12,15	220 min.	18′ 6″

Hieruit zien we, dat de onderlinge waarden bij 36—37° C. ruim 1 minuut, bij 39—40° C. eveneens ruim 1 minuut uiteenloopen en dat de gemiddelden respectievelijk 19′ 38″ en 18′ 1″ bedragen. Ook hieruit blijkt weer de gunstige invloed van een temperatuur van 39—40° C. boven eene van 36—37° C. In vergelijking met den eersten colistam vermenigvuldigt laatste zich iets sneller; de verschillen zijn evenwel niet groot en bedragen ± 2 minuten.

---

3. *Bact. coli comm.* gekweekt uit de urine van een *cystitislijder* (Utrecht).

TABEL X.

Temperatuur *36—37° C.*

Volg-nummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	22° C.	I A en II B	12,83	260 min.	20′ 16″
2	37° C.	I B en II A	11,44	235 min.	20′ 32″
3	40° C.	I D en II B	10,63	210 min.	19′ 45″
4	37° C.	I B en II BC	12,55	250 min.	19′ 55″
5	37° C.	I B en II AB	11,79	250 min.	21′ 12″
6	37° C.	I C en II A	10,66	210 min.	19′ 42″
7	37° C.	I C en II A	10,66	220 min.	20′ 38″
8	22° C.	I A en II C	13,63	290 min.	21′ 16″
9	40° C.	I CD en II BC	11,38	235 min.	20′ 39″
10	40° C.	I E en II CD	11,18	235 min.	20′ 7″

TABEL XI.

Temperatuur *39—40° C.*

Volgnummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	22° C.	I A en II D	14,35	260 min.	18′ 7″
2	37° C.	I C en II C	12,15	210 min.	17′ 16″
3	37° C.	I C en II BC	11,74	215 min.	18′ 19″
4	22° C.	I A en II E	14,96	290 min.	19′ 23″

Ook deze stam gedraagt zich volkomen als de vorige en maakt een nadere bespreking overbodig.

Op dezelfde wijze nu werden proeven genomen met betrekking tot den generatieduur van *Bacillus typhosus.*

De aard der troebeling, door dit organisme in bouillon teweeggebracht, wijkt in geenen deele af van die, welke Bact. coli comm. doet zien, zoodat ook dit organisme volkomen goed eene beoordeeling der snelheid van vermenigvulding onder de genoemde voorwaarden met behulp van de methode, welke ik noem *„de methode door vergelijking met standaardtroebelingen"* toelaat.

Ook hier interesseerde mij speciaal de verhouding bij 36—37° C. en 39—40° C., vooral omdat met dit organisme Max Müller in het reeds te voren geciteerde onderzoek geen verschillen bij normale lichaamstemperatuur en koortstemperatuur kon waarnemen.

De verhoudingen, waaronder dit organisme gekweekt werd, zijn volkomen gelijk aan die voor Bact. coli comm.

4. *Bac. typhosus*, kort te voren uit de urine van een typhuslijder gecultiveerd.

Het oogje, waarmee geënt werd, had een capaciteit van 1,1 mgr. en de hoeveelheid bouillon, waarin geënt werd, bedroeg 5 c. c.

TABEL XII.

Temperatuur: *36—37° C.*

Volgnummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	22° C.	I AB en II B	12,49	380 min.	30′ 25″
2	40° C.	I D en II C	11,43	320 min.	27′ 59″
3	22° C.	I B en II C	12,96	365 min.	28′ 10″
4	„	I AB en II A	11,79	350 min.	29′ 41″
5	„	I A en II C	13,63	405 min.	29′ 43″

TABEL XIII.

Temperatuur: *39—40° C.*

Volgnummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	22° C.	I AB en II CD	13,65	380 min.	27′ 46″
2	40° C.	I D en II D	12,15	320 min.	26′ 20″
3	22° C.	I B en II D	13,67	365 min	26′ 42″
4	„	I AB en II B	12,49	350 min.	28′ 1″
5	„	I A en II DE	14,65	405 min.	27′ 38″

Met geringe verschillen der onderlinge waarden doen de gemiddelden: 29′ 12″ bij 36—37° C. en 27′ 17″ bij 39—40° C. duidelijk de schaal ten gunste van de hoogere temperatuur omslaan en nog duidelijker spreekt dit bij een tweeden stam van bac. typhosus.

5. *Bac. typhosus*, sinds lang in het Hygiënisch Laboratorium aanwezig.

TABEL XIV.

Temperatuur: *36—37° C.*

Volgnummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	22° C.	I B en II B	12,15	365 min.	30′ 2″
2	„	I D en II B	10,46	315 min.	30′ 7″
3	„	I C en II B	11,23	355 min.	31′ 37″

TABEL XV.

Temperatuur: *39—40° C.*

Volgnummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	22° C.	I B en II D	13,84	365 min.	26′ 23″
2	„	I D en II CD	11,76	295 min.	25′ 15″
3	„	I C en II D	12,92	345 min.	26′ 42″

De gemiddelde waarden 30′ 35″ en 26′ 7″ doen duidelijk de snellere vermenigvuldiging bij 39—40° C. zien. Ook dit kan men op eenvoudige wijze controleeren door met hetzelfde oogje uit dezelfde bouilloncultuur twee gelijke buisjes bouillon te enten, het eene bij 36—37° C. en het andere bij 39—40° C. te plaatsen en nu het oogenblik af te wachten, waarop beide een lichte troebeling vertoonen. Dan is de cultuur bij 39—40° C. constant troebeler.

Enkele waarnemingen bij 22° C. geven voor den generatieduur een gemiddelde waarde van 130′.

Evenals bij Bact. coli comm. komen de gevonden waarden vrijwel overeen met die welke Max Müller en Hehewerth onder de genoemde omstandigheden vonden.

Deze bedroegen toch ± 33′ als gemiddelde bij 37° C. en liggen iets hooger dan de door mij meegedeelde. Ook

hiervoor dient in hoofdzaak het feit aansprakelijk gesteld te worden, dat zij uit oudere culturen overentten en dus de periode van rust bij de berekening van den generatieduur meer beteekenis had. Ook hier zijn de door mij gevonden waarden dichter bij de waarheid.

Vergelijken we nu de uitkomsten der generatieduur bepalingen van drie colistammen en twee typhusstammen, waarmee ik kon experimenteeren, dan valt direkt een verschijnsel op, dat namelijk de vermenigvuldiging van Bact. coli comm. in bouillon veel sneller plaats vindt dan van Bact. typhosus en wel bedraagt het verschil bijna 10 minuten. Trof het reeds, dat stammen van zoo verschillende herkomst, hetgeen later ook voor Bact. pyocyaneus duidelijk zal blijken, onderling slechts geringe verschillen in de waarden voor den generatieduur onder gelijke omstandigheden vertoonen, zoo mag hier ter plaatse de mogelijkheid vooropgesteld worden, dat wellicht en vooral nu de generatieduur op zoo eenvoudige, weinig tijd roovende wijze kan bepaald worden, deze berekening van den generatieduur als differentieel diagnosticum voor de herkenning van deze twee in zoovele opzichten overeenkomende organismen waarde heeft naast de methoden, die voor de differentieering ons ten dienste staan. Dit is nog van te meer belang, omdat de bekende kenmerken van verschil als bewegelijkheid, gasvorming, zuurvorming, indolreactie, melkcoagulatie, speciale voedingsbodems, serumreactie en wat dies meer zij, om met onze oostelijke naburen te spreken, niet algemeen als „völlig einwandsfrei" aangenomen worden. Voor zoover de genoemde vijf stammen een oordeel toelaten, stelt onder de bepaalde omstandigheden 25′ als waarde voor den generatieduur de grens voor, waarboven wij met

Bac. typhosus en waaronder we met Bact. coli comm. te doen hebben (natuurlijk wanneer van deze beide organismen slechts sprake is) en dan is, als we zagen, deze grens nog vrij ruim.

Nu zijn evenwel de organismen van de verschillende stammen van te voren eenigen tijd op kunstmatige bodems gekweekt en komt het er in praxi voornamelijk op aan de diagnose te stellen, wanneer het micro-organisme zoo juist uit het dierlijk lichaam is geïsoleerd. Zeer goed zou dit natuurlijk andere uitkomsten voor den generatieduur kunnen opleveren. Eénmaal ben ik nu in de gelegenheid geweest dit na te gaan en wel met een organisme tot de coligroep behoorende, dat zoo juist uit een processus vermiformis was gekweekt. Van de gelatine plaat is slechts één overenting op agar-agar gemaakt en hiervan heb ik mijn bouillonculturen voor de bepaling van den generatieduur geënt.

Zooals de uitkomsten in Tabel XVI en XVII doen zien komt de generatieduur geheel overeen met die van Bact. coli comm. en werd mij daarna medegedeeld, dat het organisme in questie daarvan ook alle eigenschappen vertoonde.

TABEL XVI.

Temperatuur: *36—37° C.*

Volg-nummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	37° C.	I D en II A	9,95	200 min.	20′ 6″
2	22° C.	I AB en II B	12,49	275 min.	22′ 1″
3	40° C.	I BC en II B	11,74	230 min.	19′ 35″
4	22° C.	I B en II C	12,96	255 min.	19′ 40″
5	40° C.	I DE en II BC	10 73	210 min.	19′ 34″
6	37° C.	I C en II A	10,66	215 min.	20′ 10″

TABEL XVII.

Temperatuur: *39—40° C.*

Volg-nummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	37° C.	I D en II C	11,43	200 min.	17′ 35″
2	22° C.	I AB en II BC	12,89	235 min.	18′ 14″
3	40° C.	I BC en II D	13,26	230 min.	17′ 21″
4	22° C.	I B en II DE	13,97	245 min.	17′ 32″
5	40° C.	I DE en II D	11,84	205 min.	17′ 19″
6	37° C.	I C en II C	12,15	205 min.	16′ 52″

Het aantal onderzochte stamculturen is te klein om er iets bepaalds uit af te leiden, maar toch zijn de resultaten zoo, dat ik in de gelegenheid hoop te zijn me op uitgebreider schaal hieromtrent een oordeel te vormen.

Van het organisme, dat thans aan de orde komt, zijn door mij drie stammen onderzocht met betrekking tot den generatieduur. Dit organisme, *Bac. pyocyaneus*, komt wat zijn groeiwijze in bouillon betreft ook overeen met Bact. coli comm. en Bac. typhosus. Alleen vertoonden de eerste en een enkele maal ook de tweede stam, speciaal wanneer de bouillonculturen overeenkwamen met de sterkere standaardtroebelingen (D en E) naast de fijne homogene troebeleling, volgens welke de verhouding van de aantallen organismen beoordeeld wordt, al was het ook zeer spaarzaam, enkele grovere vlokken, op welk verschijnsel niet nader werd ingegaan, aangezien dit te ver van het te behandelen onderwerp zou voeren. Het is voldoende mede te deelen, dat deze grovere vlokjes voor de beoordeeling van den generatieduur geen merkbare beteekenis hebben, daar dan toch de bepalingen bij deze sterkere graden van troebelheid anders zouden moeten uitvallen als die, welke

bij vergelijking met lichtere standaardtroebelingen (A, B. en C.) verricht werden. Dit is, als uit de hier volgende waarden blijkt, absoluut niet het geval en hieruit is tevens te constateeren, dat deze vormsels geen storenden invloed op de generatieduurbepalingen met de methode door vergelijking met standaardtroebelingen uitoefenen.

Aangezien nu door Hehewerth alleen voor Bact. coli comm. en Bac. typhosus bepalingen van den generatieduur met behulp van de microscopische telmethode gedaan zijn en ik dus voor de genoemde organismen geene bepalingen met deze tot nu toe best bekende methode behoefde te verrichten, kwam het me gewenscht voor ten aanzien van Bac. pyocyaneus en de andere organismen tegelijkertijd proeven met de microscopische telmethode te nemen om hieraan de methode door vergelijking met standaardtroebelingen te kunnen toetsen en mij tevens een vergelijkend oordeel over de waarde van deze twee te kunnen vormen. Daarbij ging ik aldus te werk, dat eerst de bepalingen met mijne methode verricht werden en direct daarna door het vervaardigen van telpraeparaten en het berekenen van het begin- en het eindaantal der organismen de generatieduur met behulp van de microscopische telmethode bepaald werd. Privaatdocent Alex. Klein was zoo vriendelijk me hiervoor eenige nuttige en praktische wenken te geven, en tevens was ik in de gelukkige omstandigheid kennis te nemen van een modificatie in de vervaardiging van het telpraeparaat, namelijk de toevoeging van een klein oogje gelatine. Aldus is men in staat de praeparaten maanden lang goed te houden en is hiermee het bezwaar van snelle ontkleuring, waarmee Hehewerth te kampen had, geheel opgeheven.

TABEL XVIII.

Bac. pyocyaneus, sinds geruimen tijd in het Hygiënisch Laboratorium aanwezig.

Temperatuur: *36—37° C.*

Volgnummer.	Methode door vergelijking met standaardtroebelingen.					Microscopische telmethode.				
	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.	a (begin aantal).	b (eind aantal).	n.	T.	G.
1	37° C.	I C en II C	12,15	385 min.	31′ 41″	52.000	282.000.000	12,40	385 min.	31′ 3″
2	„	I CD en II B	10,98	370 min.	33′ 41″					
3	„	I C en II C	12,15	390 min.	32′ 5″	30.000	121.000.000	11,98	390 min.	32′ 33″
4	„	I E en II CD	11,18	365 min.	32′ 39″					
5	40° C.	I C en II BC	11,74	365 min.	31′ 11″					

TABEL XIX.

Temperatuur: *39—40° C.*

Volgnummer.	Methode door vergelijking met standaardtroebelingen.					Microscopische telmethode.				
	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n	T.	G.	a (begin aantal).	b (eind aantal).	n.	T.	G.
1	37° C.	I CD en II BC	11,39	370 min.	32′ 29″	40.000	109.000.000	11,41	370 min.	32′ 25″
2	„	I C en II C	12,15	390 min.	32′ 5″					
3	„	I E en II D	11,54	365 min.	31′ 38″	85.400	212.000.000	11,28	365 min.	32′ 21″
4	40° C.	I C en II BC	11,74	365 min.	31′ 11″					

Uit deze waarnemingen blijkt behalve de weer geringe onderlinge verschillen binnen de grens van de fout der methode 1° een overeenstemming der uitkomsten met beide methoden en 2° in tegenstelling met wat we voor Bact. coli comm. en Bac. typhosus vonden geen noemenswaardig verschil in groei bij 36—37° C. en 39—40° C., wat ook direkt hieruit te zien is, dat bij enting tegelijkertijd van 2 gelijke buisjes bouillon met hetzelfde oogje op een gegeven oogenblik in deze twee, waarvan er een bij 36—37° C en een bij 39—40° C. geplaatst werd, geen noemenswaardig verschil in troebelheid te constateeren valt. Tevens zien we, dat de generatieduur van Bac. pyocyaneus (en dit is ook het geval bij de twee hier volgende stammen) vrijwel overeenkomt met die van Bac. typhosus onder dezelfde omstandigheden, voor zoover dit een temperatuur van 36—37° C. betreft.

Eigenaardig is voorzeker ook, dat Bac. pyocyaneus, een organisme, dat, als o. a. uit onderzoekingen van Fischer[1]) blijkt, voor zijne vermeerdering met zoo bij uitstek weinig voedingsmateriaal tevreden is, zoodat het zelfs in een vloeistof, die behalve de gewone zouten slechts kalisalpeter bevat, kan groeien, in vergelijking met Bact. coli comm. en zooals zal blijken ook Vibrio cholerae, die tegenover het voedingsmateriaal zich als grooter lekkerbekken doen kennen, in een gunstig medium als bouillon betrekkelijk langzaam zijn deeling tot stand brengt.

1) Vorlesungen über Bacteriën, Jena 1897, pag. 53.

7. *Bac. pyocyaneus* (Utrecht; meer dan 2 jaren oude cultuur).

TABEL XX.

Temperatuur: *36—37° C.*

Volgnummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	22° C.	I B en II AB	11,79	365 min.	30′ 57″
2	„	I A en II BC	13,23	415 min.	31′ 22″
3	„	I C en II BC	11,74	415 min.	35′ 21″

TABEL XXI.

Temperatuur: *39—40° C.*

Volgnummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	22° C.	I B en II B	12,15	365 min.	30′ 2″
2	„	I A en II BC	13,23	415 min.	31′ 22″
3	„	I C en II C	12,15	415 min.	34′ 9″

8. *Bac. pyocyaneus* (Utrecht; uit mamma abces; een jaar geleden verkregen).

TABEL XXII.

Temperatuur: *36—37° C.*

Volgnummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	22° C.	I B en II B	12,15	370 min.	30′ 27″
2	22° C.	I AB en II BC	12,89	410 min.	31′ 48″
3	„	I C en II BC	11,74	415 min.	35′ 21″

TABEL XXIII.

Temperatuur: *39—40° C.*

Volgnummer.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.
1	22° C.	I B en II B	12,15	370 min.	30′ 27″
2	„	I AB en II BC	12,89	410 min.	31′ 48″
3	„	I C en II CD	12,50	415 min.	33′ 12″

Ook deze twee stammen, van geheel verschillende herkomst, stemmen volkomen overeen met den eersten stam en verhouden zich speciaal wat betreft een temperatuurverschil van 36—37° C. en 39—40° C. precies eender.

Het zij me veroorloofd hier, wat me vooral met het oog op een vroegere publicatie (Centralblatt Bd. XXV) interesseerde, er op te wijzen, dat de twee laatste stammen, zooals ik ze uit Utrecht ontving, zeer veel pyocyanin op agar-agar vormden, terwijl een overenting op agar-agar van het Amsterdamsche laboratorium zoo goed als geen kleurstofproductie te voorschijn bracht. Ten aanzien van de kleurstofvorming schijnen dus kleine verschillen in den voedingsbodem van beteekenis te zijn en het is mogelijk niet van belang ontbloot deze plotselinge variatie in de kleurstofproductie aan een nader onderzoek te onderwerpen.

---

9. Denzelfden aard van troebeling als de genoemde organismen vertoont ook *Vibrio cholerae* in bouillon.

Wel is dit kleinste wezen tegenover Bact. coli comm. hierdoor gekenmerkt, dat de bouillonculturen veel spoediger een huidje aan de oppervlakte vormen, doch dit is nooit het geval geweest in zoo jonge culturen als die welke in troebelheid met een mijner standaardtroebelingen overeenkwamen, zoodat hier van een storenden invloed door ongelijkmatige verdeeling der organismen geen sprake kan zijn. Behalve dat bovendien nog bij de bepaling de buisjes flink geschud werden leveren vergelijkende waarnemingen met de microscopische telmethode dezelfde uitkomsten op.

De stam, welke mij in het Hygiënisch Laboratorium ten dienste stond, was daar sinds jaren aanwezig:

TABEL XXIV. Temperatuur : *36—37° C.*

Volgn.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Methode door vergelijking met standaardtroebelingen. Vergelijking.	n.	T.	G.	Microscopische telmethode. a.	b.	n.	T.	G.
1	22° C.	I D en II D	12,15	260 min.	21′ 23″	47.400	203.000.000	12,06	260 min.	21′ 34″
2	37° C.	I D en II A	9,95	205 min.	20′ 36″					
3	37° C.	I E en II B	10,02	205 min.	20′ 28″	178.000	34.000.000	7,58	205 min.	27′ 3″
4	22° C.	I E en II D	11,54	245 min.	21′ 14″					
5	„	I B en II BC	12,55	280 min.	22′ 19″					
6	„	I D en II D	12,15	270 min.	22′ 13″					
7	37° C.	I D en II A	9,95	200 min.	20′ 6″					
8	22° C.	I C en II C	12,15	255 min.	20′ 59″					
9	40° C.	I C en II CD	12,50	265 min.	21′ 12″					
10	22° C.	I D en II D	12,15	260 min.	21′ 23″					

TABEL XXV. Temperatuur : *39—40° C.*

Volgn.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Methode door vergelijking met standaardtroebelingen. Vergelijking.	n.	T.	G.	Microscopische telmethode. a.	b.	n.	T.	G.
1	37° C.	I D en II B	10,63	205 min.	19′ 17″	48.000	60.600 000	10,30	205 min.	19′ 54″
2	22° C.	I D en II D	12,15	260 min.	21′ 23″					
3	37° C.	I E en II C	10.83	205 min.	18′ 56″					
4	37° C.	I D en II B	10,63	200 min.	18′ 49″	44.600	64.000.000	10,49	200 min.	19′ 4″
5	22° C.	I E en II DE	11,84	245 min.	20′ 41″					
6	„	I B en II CD	13,31	280 min.	21′ 1″					
7	„	I C en II C	12,15	255 min.	20′ 59″					
8	40° C.	I C en II D	12,86	265 min.	20′ 36″					
9	22° C.	I D en II DE	12,45	260 min.	20′ 53″					
10	„	I D en II E	12,75	270 min.	21′ 11″					

De gemiddelde waarden bij 36—37° C. en 39—40° C., respectievelijk 21′ 9″ en 20′ 23″, doen zien, dat het bij Bact. coli comm. en Bact. typhosus gevonden verschil hier zeer gering is.

Toch was, zij het dan ook veel minder evident, bij vergelijking van 2 gelijke buisjes bouillon, met hetzelfde oogje uit dezelfde cultuur geënt, constant op hetzelfde oogenblik de cultuur bij 39—40° C. iets troebeler dan bij 36—37° C.

10. Meerdere stammen van Vibrio cholerae stonden mij niet ter beschikking. Evenwel was in het Hygiënisch Laboratorium een organisme aanwezig, dat veel overeenkomst met Vibrio cholerae vertoont. Dit kleinste wezen, de *Vibrio Dunbar*, onderscheidt zich hiervan in hoofdzaak door het gemis aan pathogeniteit; haar groeiwijze in bouillon is evenwel volkomen dezelfde als die van Vibrio cholerae en ook gelijken beide in vorm en grootte precies op elkaar. Daarom kwam het me gewenscht voor ook van dit organisme enkele generatieduurbepalingen te doen om te zien, of er mogelijk verschil in snelheid van groei onder voor beiden gelijke omstandigheden valt waar te nemen. Zooals de uitkomsten in de volgende tabellen aantoonen is dit veel minder uitgesproken als bij Bact. coli comm. en Bact. typhosus, waar de waarden voor den generatieduur bijna 10 minuten uiteenloopen.

Tabel XXVI.

Temperatuur: *36—37° C.*

Volgnummer.	Methode door vergelijking met standaardtroebelingen.					Microscopische telmethode.				
	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.	a.	b	n.	T.	G.
1	22° C.	I BC en II B	11,78	275 min.	23′ 21″					
2	„	I A en II CD	14,29	320 min.	22′ 23″	19.340	427.300.000	14,43	320 min.	22′ 10″
3	„	I C en II DE	13,23	305 min.	23′ 3″					
4	„	I A en II C	13,91	325 min	23′ 21″					
5	„	I CD en II C	11,76	285 min	24′ 14″	40.000	90.900.000	11,15	285 min.	25′ 33″

Tabel XXVII.

Temperatuur: *39—40° C.*

Volgnummer.	Methode door vergelijking met standaardtroebelingen.					Microscopische telmethode.				
	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Vergelijking.	n.	T.	G.	a.	b.	n.	T.	G.
1	22° C.	I BC en II BC	12,15	275 min.	22′ 38″	42.600	245.000.000	12,49	275 min.	22′ 1″
2	„	I A en II B	12,99	320 min.	24′ 38″					
3	„	I C en II DE	13,23	305 min.	23′ 3″	48.000	500.000.000	13,25	305 min.	22′ 51″
4	„	I A en II D	14,68	325 min.	22′ 8″	8.660	354.000.000	15,32	325 min.	21′ 13″
5	„	I CD en II CD	12,15	285 min.	23′ 27″					

Een blik op deze beide tabellen is voldoende om te doen zien, dat het meermalen aangehaalde temperatuurverschil voor Vibrio Dunbar van geen beteekenis ten aanzien der snelheid van vermenigvuldiging is. Deze vermeerdering geschiedt iets trager dan bij Vibrio cholerae; evenwel zijn de verschillen gering en is een verdere uitweiding overbodig.

De organismen, die tot nu toe de revue gepasseerd hebben, zijn allen bewegelijk en maken door de fijne gelijkmatige troebeling, die ze in bouillon teweegbrengen, eene gemakkelijke beoordeeling in de verhouding van hunne vermeerderingssnelheid mogelijk. Het interesseerde me nu, of ook onbewegelijke kleinste wezens een beoordeeling van hunnen generatieduur in bouillon zouden toelaten en dus de methode door vergelijking met standaardtroebelingen en daarnaast de microscopische telmethode in ruimen zin geschikt zijn om voor de berekening van den generatieduur der bacteriën hunne diensten te verleenen. Daartoe heb ik nog een tweetal verschillende soorten onder handen genomen, en wel *Staphylococcus pyogenes albus* en *Bac. diphtheriae.*

---

11. *Staphylococcus pyogenes albus*, in het Hyg. Lab. gekweekt, veroorzaakt in bouillon een neerslag met fijne troebeling. Schudt men de bouilloncultuur even, dan wordt deze troebeling homogeen over den inhoud van het buisje verdeeld en gelijkt zeer veel op een cultuur van Bact. coli comm. met dit verschil evenwel, dat bij schudden de kleine deeltjes minder bewegelijk voor het oog zich voordoen. Eene beoordeeling der troebeling is dan evenwel zeer goed mogelijk en levert in het minst geen bezwaren op. Uitkomsten hiernevens.

Tabel XXVIII.

Temperatuur: *36—37° C.*

Volgn.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Methode door vergelijking met standaardtroebelingen.				Microscopische telmethode.				
		Vergelijking.	n.	T.	G.	a.	b.	n.	T.	G.
1	37° C.	I E en II D	11,54	650 min.	56′ 19″					
2	„	I CD en II CD	12,15	650 min.	53′ 29″					
3	40° C.	I D en II D	12,15	650 min.	53′ 29″					
4	37° C.	I CD en II DE	12,80	685 min.	53′ 31″	7.200	109.000.000	13,88	685 min.	49′ 21″
5	„	I DE en II DE	12,15	660 min.	54′ 19″	24.000	109.000.000	12,14	660 min.	54′ 22″
6	„	I DE en II D	11,84	695 min.	58′ 41″					
7	40° C.	I C en II D	12,86	715 min.	55′ 35″	6.200	65.450.000	13,36	715 min.	53′ 31″

Tabel XXIX.

Temperatuur: *39—40° C.*

Volgn.	Temperatuur waarbij I gegroeid.	Methode door vergelijking met standaardtroebelingen.				Microscopische telmethode.				
		Vergelijking.	n.	T.	G.	a.	b.	n.	T.	G.
1	37° C.	I E en II C	10,83	690 min.	63′ 43″					
2	„	I CD en II C	11,78	690 min.	58′ 34″					
3	„	I CD en II C	11,78	720 min.	61′ 7″					
4	„	I DE en II C	11,13	680 min.	61′ 5″					
5	„	I DE en II C	11,13	705 min.	63′ 20″	24.000	30.300.000	10,30	705 min.	68′ 27″
6	40° C.	I C en II BC	11,74	715 min.	60′ 54″					

De generatieduur is belangrijk grooter dan bij de tot nu toe onderzochte organismen; de vermenigvuldiging geschiedt dus veel langzamer voor zoover dit bouillon betreft. Voor de eerste maal ontmoeten we hier een organisme, dat aan een temperatuur van *37° C. de voorkeur geeft* boven een temp. van *40° C.* De gemiddelde generatieduur in de twee tabellen bedraagt 55′ 3″ bij 37° C. en 61′ 27″ bij 40° C., hetgeen een verschil van bijna $6\frac{1}{2}$ minuten maakt ten nadeele van een temp. van 40° C. en dit wel constant in dezelfde richting.

Ook de onderlinge waarden loopen meer uiteen als tot nu toe het geval was. De oorzaak hiervan kan verschillend zijn en wel: 1° grootere fout met de methode gemaakt; wanneer toch in vergelijking met Bact. coli comm. de tijd (T). ± 3 × zoo groot is om een zelfde aantal generaties te doen plaats hebben, moet in de formule $G = \frac{T}{n}$ voor den generatieduur de fout met de methode naar evenredigheid toenemen; 2° grootere verschillen in de aantallen organismen, die bij verschillende overentingen met hetzelfde oogje ingebracht worden, daar Staphylococcus de eigenschap heeft in hoopjes bij elkaar te liggen en dus deze factor in tegenstelling met de tot nu toe aangehaalde organismen, waar de microscopische verdeeling in den bouillon geheel gelijkmatig is, een rol gaat spelen. Als derde factor kan aan de microscopische telmethode nog het bezwaar verbonden zijn, dat in het telpraeparaat de organismen niet gelijkmatig verdeeld zijn over de verschillende gezichtsvelden, al roert men te voren de emulsie van cultuur en kleurstof nog zoo goed, zoodat, hetgeen ook voor Bac. diphtheriae van beteekenis kan zijn, bij een telling van 50 gezichtsvelden de aantallen organismen in verschillende praeparaten, met hetzelfde oogje vervaardigd, meer uiteenloopen.

Voor de macroscopische beoordeeling, zooals ze bij de methode door vergelijking met standaardtroebelingen geschiedt, doet zich dit bezwaar niet gelden, daar voor het bloote oog de verdeeling volkomen homogeen is.

---

13. En nu ben ik ten slotte aangeland bij *Bac. diphtheriae*, een organisme, dat een geheel andere groeiwijze in bouillon vertoont. In plaats van de fijne troebeling, waarmee we tot nu toe te maken hadden, presenteert de bouilloncultuur zich als een vrij heldere vloeistof, waarin bij licht opschudden grovere korrels zweven. Hoe ouder de cultuur wordt, des te grooter aantal van deze iets minder dan speldeknop groote korrels optreden. Schudt men zeer heftig, dan komt wel een lichte fijne troebeling daarnaast voor den dag, doch homogeen troebel is de cultuur moeilijk te krijgen.

Wil men dus hier de bepaling met de methode door vergelijking met standaardtroebelingen verrichten, dan dient men naar een andere stof uit te zien, wier suspensie overeenkomst met een bouilloncultuur van Bac. diphtheriae vertoont. Dit nu is niet moeilijk door in plaats van de meest fijne deeltjes talk, die zooals in hoofdstuk II beschreven is door herhaalde decantatie verkregen worden, de meer grovere talkkorrels te nemen en hiervan op de gewone wijze standaardtroebelingen met de bepaalde quantitatieve verhoudingen te vervaardigen.

De wijze van uitvoering is, zooals we vroeger reeds zagen, zeer eenvoudig en tijdroovend is de bewerking zeker niet.

De aldus verkregen standaardtroebelingen vertoonen overeenkomst met bouillonculturen van Bac. diphtheriae.

Voor de verkregen uitkomsten vergelijke men tabel XXX.

TABEL XXX.

Temperatuur: 36—37° C.

De cultuur, waaruit overgeënt werd, was steeds bij 37° C. gegroeid.

Volg-nummer.	Methode door vergelijking met standaardproefbelingen.			Microscopische telmethode.				
	Vergelijking.	n.	T.	G.	a.	b.	n.	T.	G.
1	I C en II BC	11,74	915 min.	77′ 56″	2.400	47.270.000	14,26	915 min.	64′ 10″
2	I BC en II BC	12,15	915 min.	75′ 18″					
3	I E en II E	12,15	925 min.	76′ 8″	28.000	101 000.000	11,82	925 min.	78′ 15″
4	I C en II CD	12,50	925 min.	74′					
5	I C en II BC	11,74	925 min.	78′ 47″					
6	I E en II B	10,02	735 min.	73′ 21″	22.200	18 200.000	9,68	735 min.	75′ 56″
7	I E en II A	9,34	735 min.	78′ 41″					
8	I D en II D	12,15	940 min.	77′ 22″					
9	I B en II C	12,96	900 min.	69′ 26″	4.000	34.100.000	13,06	900 min.	68′ 55″
10	I B en II B	12,15	900 min.	74′ 4″					
11	I C en II C	12,15	960 min.	77′ 46″					
12	I CD en II A	10,30	810 min.	78′ 32″					
13	I CD en II A	10,30	780 min.	70′ 52″					
14	I C en II A	10,66	740 min.	69′ 25″					

Hieruit volgt, dat de gemiddelde waarde voor den generatieduur van Bac. diphtheriae in bouillon 75′ bedraagt en de vermenigvuldiging veel langzamer geschiedt als bij de tot nu toe besproken organismen.

De waarden loopen in 14 waarnemingen uiteen van 69′ 25″ tot 78′ 47″, betwelk een verschil van bijna 10 minuten of een fout van bijna 15 % oplevert.

De oorzaak is ook hier:

1°. de langere duur der proef (grootere waarde voor T).

2°. het niet gelijkmatig verdeeld zijn der organismen in de cultuur, waaruit een oogje wordt overgeënt en

3°. voor de microscopische telmethode nog de minder gelijkmatige verdeeling der bacteriën in de verschillende gezichtsvelden.

Het bewijs voor de tweede genoemde oorzaak kan men ook direkt hieruit afleiden, dat wanneer men met hetzelfde oogje uit dezelfde bouilloncultuur twee gelijke buisjes bouillon ent en deze twee bij dezelfde temperatuur van 37° C. plaatst, na eenzelfden duur van groei hun troebelheid niet gelijk is; hierdoor kan alleen reeds een verschil van 4′ verklaard worden.

Bij de proeven deed zich het opvallende verschijnsel voor, dat bij een temp. van *39—40° C.* na enting van betrekkelijk kleine hoeveelheden, die in een oogje zich bevinden, zelfs na dagen geen vermeerdering zichtbaar is. Dit feit is zoo opmerkelijk, dat ik in een volgend hoofdstuk (V) op deze questie terug zal komen.

Het aantal onderzochte organismen is naar mijn meening groot genoeg om daaruit de bruikbaarheid der nieuwe methode in te zien en dit te meer, daar ook met organismen geëxperimenteerd werd, die grootere moeilijkheden voor de bepaling van den generatieduur opleveren.

Hier is het ook de plaats om even terug te komen op de aan het einde van hoofdstuk II te berde gebrachte

mogelijkheid, dat de troebelheid eener cultuur, overeenkomende met de sterkste standaardtroebeling (E), valt buiten het tijdstip, waarop nog de generatieduurbepaling verricht mag worden, dat m. a. w. reeds het tijdstip van niet vermenigvuldiging, waarop Hehewerth gewezen heeft, bereikt kan zijn. Bovendien, al is de bepaling bij overeenkomst met standaardtroebeling E voor een bepaald organisme geoorloofd, dan bewijst dit nog volstrekt niet, dat dit evenzeer voor de andere het geval moet zijn. Als men nu de verschillende tabellen eens wil nazien zal men opmerken, dat deze vrees ongegrond is; binnen de fout der methode wijken de bepalingen, waarbij troebeling E betrokken is, in geenen deele en zeker niet regelmatig in ééne richting af van die, waarbij andere troebelingen in het spel zijn en ook geven de vergelijkende bepalingen met de microscopische telmethode hiervoor geen schijn of schaduw van bewijs te zien.

De in dit hoofdstuk verkregen uitkomsten resumeerende kom ik tot de volgende conclusies:

1° *De methode door vergelijking met standaardtroebelingen is de eenvoudigste voor de berekening van den generatieduur der bacteriën en doet wat nauwkeurigheid betreft niet onder voor de tot nu toe best bekende, de microscopische telmethode van Alex Klein.*

2° *In op de gewone wijze bereiden voedingsbouillon, neutraal ten opzichte van blauw lakmoespapier, bedraagt de generatieduur bij een temperatuur van 36—37° C. van:*

Bact. coli comm.: 21', *Bac. typhosus: 30',*
Bac. pyocyaneus: 32',
Vibrio cholerae: 21', *Vibrio Dunbar: 23',*
Staphylococcus pyogenes albus: 55' en
Bac. diphtheriae: 75',

bij een temperatuur van 39—40° C. bedraagt de generatieduur van:

Bact. coli comm.: 18', Bac. typhosus: 27',

Bac. pyocyaneus: 32',

Vibrio cholerae: 20', Vibrio Dunbar: 23' en

Staphylococcus pyogenes albus: 61';

waaruit volgt een verschil ten gunste van een temp. van 39—40° C. voor Bact. coli comm., Bac. typhosus en Vibrio cholerae,

een verschil ten nadeele van een temp. van 39—40° C. voor Staphylococcus pyogenes albus en Bac. diphtheriae en geen verschil voor Bac. pyocyaneus en Vibrio Dunbar.

3° *Dat voor pathogene organismen de optimum temperatuur bij 37° C. ligt, mag niet gegeneraliseerd worden.*

4° *Stammen van verschillende herkomst vertoonen geen noemenswaardige verschillen in de snelheid van hunne vermenigvuldiging in bouillon, wanneer ze aan dit voedingsmedium gewend zijn en evenmin is het van invloed of de organismen lang of kort geleden het dierlijk lichaam gepasseerd zijn.*

VIERDE HOOFDSTUK.

BEPALING VAN DEN INVLOED DER IN CULTUREN VAN VERSCHILLENDEN OUDERDOM AANWEZIGE NADEELIGE MOMENTEN VOOR HET VOORTBESTAAN EN DE VERMEERDERING VAN BACTERIËN MET BEHULP VAN DE NIEUWE METHODE TER BEPALING VAN DEN GENERATIEDUUR.

Bij het toenemen van den leeftijd eener bouilloncultuur worden daarin stoffen geproduceerd, nadeelig voor het voortbestaan der organismen.

Deze stoffen zijn zoowel produkten van stofwisseling als afkomstig van uiteenvallende doode bacteriën. Mogelijk ook vermindert door het verbruik de voedingswaarde van den bouillon en doen reactieveranderingen hun invloed gelden.

Dat deze momenten van beteekenis zijn voor het voortbestaan en de vermeerdering der bacteriën blijkt direkt hieruit, dat in een oudere cultuur steeds afgestorven organismen aanwezig zijn en de nog levende bij overenting in een versch cultuurmedium eenigen tijd wachten, alvorens tot vermenigvuldiging over te gaan. Bij de bespreking van het tijdperk van rust na de overenting in het vorige hoofdstuk werd hierop reeds de aandacht gevestigd.

Uit het onderzoek van Hehewerth, die het aantal doode en levende organismen in culturen van verschillenden ouderdom naging door het totale aantal met de microscopische telmethode en het aantal levende met de plaatmethode te bepalen volgt, dat behalve de afsterving ook

nog een vermenigvuldiging plaats vindt, evenwel zoo, dat het aantal levende na zekeren tijd geleidelijk afneemt. Die vermindering kan niet anders verklaard worden dan door aan te nemen, dat ze door versterking der bovengenoemde nadeelige momenten wordt beheerscht.

De grootere periode van rust na de overenting uit oudere culturen wijst er tevens op, dat de daarin aanwezige levende organismen niet in de voordeeligste condities verkeeren en met name in hunne vermeerdering belemmerd zijn.

Dit laatste punt nu heeft H. bij zijn proeven buiten beschouwing gelaten. Hij bepaalde alleen het aantal doode en levende organismen, zonder zich er verder een oordeel over te vormen in welke condities deze levende verkeeren. En toch is hiervan de beteekenis even groot als, om eens een vergelijking te gebruiken, voor een leger naast het aantal gesneuvelden ook het aantal gewonden voor de beoordeeling van den toegebrachten slag gewicht in de schaal legt. Om zich nu een idee te vormen van de belemmering in groei, die de organismen in culturen van verschillenden ouderdom ondervinden, kan men met behulp van de microscopische telmethode zonder meer tot het doel geraken en wel door eensdeels het totale aantal direkt te bepalen en daarnaast te berekenen, met welk aantal organismen, wier vermenigvuldiging onder normale omstandigheden in bouillon plaats vindt, het aantal levende in culturen van verschillenden ouderdom gelijkwaardig is. Daarin hebben we dan een direkte maat voor de belemmering in groei, die de organismen in oude culturen ondervinden en tevens voor den invloed, dien de nadeelige momenten op de vermeerdering uitoefenen. De wijze van uitvoering is nu als volgt.

Neem van een aantal generatieduurbepalingen van bijv. Bact. coli comm. in bouillon bij 37° C. het

gemiddelde; dit wijkt zeer weinig van de werkelijke waarde van den generatieduur onder de genoemde omstandigheden af. Maak nu met een oogje van een bepaalde capaciteit uit de bouilloncultuur, waarvan men de belemmering in groei van het aantal levende organismen wil leeren kennen, een overenting in neutralen voedingsbouillon en bepaal na een tijd T, waarin deze bouillon licht troebel is geworden, door het maken van een telpraeparaat het aantal aanwezige organismen, d. i. het eindaantal b. Dan weten we, bij bekend zijn van G en T (en daardoor n uit $n = \frac{T}{G}$) benevens b, uit de formule $n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$ het aantal organismen a, dat onder normale omstandigheden noodig zou zijn om na den genoemden tijd T zich tot een aantal b te vermeerderen. Dit getal a stelt dan, als ik het zoo eens noemen mag, het aantal met volle energie ten aanzien van de vermeerdering bedeelde organismen voor, waarvan de waarde bij de overenting even groot is als die van het aantal levende organismen, dat zich bevindt in een oogje der bouilloncultuur, waarvan men de belemmering in groei wil leeren kennen.

De methode komt dus hierop neer, dat men bij bekend zijn van den normalen generatieduur uit de formules $n = \frac{T}{G}$ en $n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$ door terugrekenen het beginaantal a te weten komt en daaruit door vergelijking zich een oordeel vormt omtrent de groeienergie van de organismen in een cultuur, die niet onder gunstige omstandigheden verkeert.

Ditzelfde kan men nu ook bereiken met behulp van de methode door vergelijking met standaardtroebelingen. Wel kan men zich hierdoor geen oordeel vormen over het totale

aantal, zoowel doode als levende organismen te samen, doch aan het doel, dat we hier nastreven, namelijk een vergelijkend overzicht te geven van de verhouding der groeienergie van de organismen in culturen van verschillenden ouderdom en den invloed der daarin zich afspelende processen op hun vermeerdering, beantwoordt ze volkomen. Kent men eenmaal den generatieduur onder normale verhoudingen en is eenmaal een vaste formule uitgewerkt, hetgeen zoo dadelijk aan de orde is, dan is de verdere uitvoering zeer eenvoudig.

Wanneer men nu datgene, wat voor de microscopische telmethode voorop gesteld werd, op de nieuwe methode toepast, komt het er hier slechts op aan, bij bekend zijn van de standaardtroebeling waarmee na zekeren tijd T de bouilloncultuur, waarin een oogje van de cultuur, die beoordeeld moet worden, was overgeënt, overeenstemt, de onbekende standaardtroebeling te berekenen, waarmee een cultuur van voor normale vermenigvuldiging geschikte organismen zou moeten overeenkomen om in groeienergie gelijkwaardig te zijn aan de te beoordeelen cultuur.

Nu weten we uit de beschrijving der nieuwe methode in het tweede hoofdstuk, vooropgesteld, dat het oogje een capaciteit van 1,1 mgr. heeft en II (zie ter plaatse) 5 c. c. bouillon bevat, dat, wanneer voor de overeenstemming van II met standaardtroebeling E 12,15 ($n = 12{,}15$) generaties zijn noodig geweest, I (de cultuur, waaruit overgeënt werd) eveneens moet overeengekomen zijn met E, of anders gezegd moet cultuur I bij zoodanige standaardtroebeling behoord hebben, dat het aantal organismen in cultuur II het $2^{12{,}15}$ voud van een oogje uit cultuur I bedraagt, en dit is E.

Hadden nu evenwel voor het ontstaan van een troebeling E 14,96 generaties ($n = 14{,}96$) moeten plaats

vinden, dan moet het aantal organismen in cultuur II het $2^{14,96}$ voud van een oogje van cultuur I bedragen en moet cultuur I dus overeengekomen zijn met standaardtroebeling A (zie het tweede hoofdstuk.)

Deze redeneering vindt zijn uitdrukking in de volgende formule:

$$X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times A,\ B,\ C,\ D \text{ of } E,$$

waarin X voorstelt de standaardtroebeling, waarmee cultuur I overeengestemd moet hebben, waarvan een oogje = 1,1 mgr. geënt werd in 5 c c. bouillon, om na zekeren tijd in deze 5 c c. bouillon (cultuur II) een troebeling te voorschijn te roepen, die overeenstemt met een der standaardtroebelingen A, B, C, D of E en n voorstelt het aantal generaties, dat in dien tijd plaats gevonden heeft.

n berekenen we bij bekend zijn van G uit: $n = \frac{T}{G}$.

Passen we nu deze formule ter nadere verduidelijking op de eerste veronderstelling toe, waarbij II na zekeren tijd overeenkomt met E en n = 12,15 generaties, dan hebben we dus:

$$X = \frac{2^{12,15}}{2^{12,15}} \times E \text{ of } X = E.$$

Nemen we de tweede veronderstelling, waarbij II eveneens overeenkomt met E, doch n = 14,96 generaties, dan hebben we:

$$X = \frac{2^{12,15}}{2^{14,96}} \times E = \frac{4545}{31815} \times E = \tfrac{1}{7} \times E$$

en $\frac{1}{7}$ E = A.

Met behulp van deze twee formules: $n = \frac{T}{G}$ en $X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times A$, B enz. is men nu in staat, wanneer de

generatieduur onder normale omstandigheden bekend is, voor alle organismen op zeer eenvoudige wijze de standaardtroebeling te berekenen, waarmee cultuur I moet overeengestemd hebben.

De energie nu, welke een bouilloncultuur van bepaalden ouderdom ten aanzien der vermenigvuldiging bezit, wordt uitgedrukt in de standaardtroebeling, waarmee een bouilloncultuur, die alleen met volle energie bedeelde organismen bevat, zou moeten overeenstemmen om gelijkwaardig te zijn aan die te beoordeelen bouilloncultuur.

Als voorbeeld om de uitvoerbaarheid van dit vraagstuk in het algemeen aan te toonen, is door mij gebruikt een stam van Bact. coli comm., waarvan het gemiddelde van 10 generatieduurbepalingen in bouillon bij 36—37° C., bij zeer geringe onderlinge afwijkingen, bedraagt: *20,5'*.

5 c. c. bouillon wordt geënt met een oogje eener bouilloncultuur. Na verschillende tijden van groei bij 37° C. maakt men hieruit een overenting met een oogje van 1,1 mgr. capaciteit in 5 c. c. bouillon en gaat dan na, in welken tijd bij 36—37° C. deze cultuur een lichte troebeling, overeenkomende met een der standaardtroebelingen A, B, C, D of E vertoont.

De cultuur, waarin aldus na verschillende tijden bij 37° C. de groeienergie van het aantal aanwezige organismen wordt bepaald, heet: *basiscultuur bij 37° C.*

Van de uitkomsten geeft de volgende tabel een overzicht.

De vergelijkende waarden voor de groeienergie in culturen van verschillenden ouderdom zijn daarin berekend op standaardtroebeling A.

Reeds vermeld is, dat de generatieduur van dezen stam van Bact. coli comm. bedraagt 20,5 min.

Tabel XXXI.

Verhoudingen der standaardtroebelingen, waarmee de culturen van organismen, die zich op de normale wijze vermeerderen, zouden moeten overeenstemmen, om gelijkwaardig te zijn aan de groeienergie der organismen, die in de basiscultuur bij 37° C. na verschillenden ouderdom der cultuur aanwezig zijn.

Volgn.	Ouderdom der basiscultuur.	Standaardtroebeling waarmee de overeenkomst bij 37° C. overeenkomt	Tijd, hiertoe noodig.	$n = \frac{T}{G}$	$X = \frac{212{,}15}{2'} \times A, B,$ enz.
1	4 u. 30 m.	A	235 m.	$n = \frac{235}{20{,}5} = 11{,}46$	$X = \frac{212{,}15}{11{,}46} \times A$ $= 1{,}61$ A
2	8 u. 5 m.	A	185 m.	$n = \frac{185}{20{,}5} = 9{,}02$	$X = \frac{4545}{29{,}02} \times A$ $= 8{,}75$ A
3	24 u.	C D	185 m.	$n = \frac{185}{20{,}5} = 9{,}02$	$X = \frac{4545}{29{,}02} \times CD = 8{,}75$ C D $= 32{,}38$ A
4	27 u. 25 m.	C	195 m.	$n = \frac{195}{20{,}5} = 9{,}51$	$X = \frac{4545}{29{,}51} \times C = 6{,}23$ C $= 17{,}44$ A
5	31 u. 50 m.	D	210 m.	$n = \frac{210}{20{,}5} = 10{,}24$	$X = \frac{4545}{210{,}24} \times D = 3{,}76$ D $= 17{,}30$ A
6	71 u. 35 m.	C	200 m.	$n = \frac{200}{20{,}5} = 9{,}75$	$X = \frac{4545}{29{,}75} \times C = 5{,}28$ C $= 14{,}78$ A
7	75 u. 5 m.	D	240 m.	$n = \frac{240}{20{,}5} = 11{,}22$	$X = \frac{4545}{211{,}22} \times D = 1{,}91$ D $= 8{,}79$ A
8	119 u. 40 m.	B C	240 m.	$n = \frac{240}{20{,}5} = 11{,}22$	$X = \frac{4545}{211{,}22} \times BC = 1{,}91$ BC $= 4{,}20$ A
9	123 u. 45 m.	B C	240 m.	$n = \frac{240}{20{,}5} = 11{,}22$	$X = \frac{4545}{211{,}22} \times BC = 1{,}91$ BC $= 4{,}20$ A
10	167 u. 40 m.	C	270 m.	$n = \frac{270}{20{,}5} = 13{,}12$	$X = \frac{4545}{213{,}12} \times C = \frac{1}{1{,}96}$ C $= 1{,}43$ A
11	191 u. 15 m.	C D	285 m.	$n = \frac{285}{20{,}5} = 13{,}90$	$X = \frac{4545}{213{,}90} \times CD = \frac{1}{3{,}36}$ CD $= 1{,}10$ A
12	238 u. 50 m.	C D	320 m.	$n = \frac{320}{20{,}5} = 15\,61$	$X = \frac{4545}{215{,}61} \times CD = \frac{1}{11}$ CD $= 0{,}34$ A

Uit deze tabel zien we, dat tot ± 24 uren na de enting de energie van een bouilloncultuur van Bact. coli comm., waaronder we dus verstaan de waarde, die zoodanige cultuur voor de overenting heeft, stijgt en daarna een regelmatige daling optreedt, zoodat na ± 239 uren in vergelijking met het oogenblik, waarop de cultuur 24 uren oud is, die energie is verminderd tot 1 %.

Tevens kunnen we direkt beoordeelen, hoe na bepaalde tijden de verschillende in het begin van dit hoofdstuk aangehaalde nadeelige momenten in een bouilloncultuur van Bact. coli comm., gegroeid bij 37° C., hun werking ten aanzien van de vermeerdering dezer organismen ontvouwd hebben.

Dat deze nadeelige invloeden reeds in een 24 uur oude cultuur aanwezig zijn volgt hieruit, dat, zoo ze niet bestonden en dus de vermeerdering der organismen volgens de normale waarde voor den generatieduur had plaats gevonden, in dezen tijd de energie der cultuur een veel grootere moest geweest zijn dan het geval is, zooals uit het volgende blijkt.

De hier gebruikte basiscultuur is geënt uit een cultuur, welke overeenkwam met standaardtroebeling A.

De generatieduur bedraagt, wanneer geene nadeelige momenten aanwezig zijn, 20,5'. Na 20,5' heeft dus 1 generatie plaats gevonden en na 24 uren of 1440 minuten zouden dus bij deze vooropstelling 70 generaties plaats gevonden hebben. Nu weten we uit de tabel in hoofdstuk II, dat, wanneer I overeenkomt met A en II met A, 12,15 generaties hebben plaats gehad. Is daarna weer 1 generatie tot stand gekomen, dus n = 13,15, dan stemt II overeen met 2 A, na 14,15 generaties met 4 A, na 22 generaties met ongeveer 1000 A, zoodat na 70 generaties de cultuur zoovele organismen zou bevatten, dat ze met een enorm groot aantal van A zou overeen-

stemmen. En hier zien we, dat in werkelijkheid de energie der organismen ten aanzien der vermenigvuldiging slechts overeenkomt met 32,38 A, zoodat in een 24 uur oude cultuur de genoemde nadeelige momenten zich hebben doen gelden. Doch ook na 8 uren is dit reeds het geval. Volgens dezelfde redeneering toch zouden dan ± 23 generaties hebben plaats gehad, waardoor het aantal organismen met ± 2000 A moest overeenkomen, terwijl ze dit in werkelijkheid met 8,75 A doen. Hierop wees ook Hehewerth reeds. Na 4 uur 30 minuten, een tijd, waarin de generatieduurbepaling verricht mag worden, is dit evenwel niet zoo. Volgens de redeneering moeten dan 13,17 generaties hebben plaats gevonden. Nu stemde de basiscultuur op dat oogenblik overeen met B en hebben dus in werkelijkheid 12,83 generaties plaats gevonden, zooals uit de tabel in hoofdstuk II blijkt. Dit kleine verschil valt binnen de fout der methode.

Verder kan men uit volgnummer 1 van tabel XXXI zien, dat de nieuwe methode ter bepaling van den generatieduur voor het hier beoogde doel zeer goed voldoet, m. a. w. dat de terugrekening, welke hier geschiedt, geen groote fouten tengevolge heeft. Door terugrekenen werd gevonden, dat de basiscultuur na 4 uur 30 minuten overeenkomt met een standaardtroebeling van 1,61 A. Zooals ik reeds mededeelde, kwam ze overeen met B en B = 1,6 A. De oorzaak moet hierin gezocht worden, dat bij meerdere generatieduurbepalingen de onderlinge waarden zoo weinig uiteenloopen en dus de gemiddelde waarde van 20,5′, welke voor dezen stam van Bact. coli comm. gevonden werd, onder de genoemde omstandigheden de werkelijkheid zeer nabij komt. Bac. diphtheriae levert, zooals later zal blijken, hiervoor meer moeilijkheden op, en daar verschillen de onderlinge waarden ook veel meer.

Naast de beoordeeling van de beteekenis der nadeelige momenten, welke zich doen gelden ten aanzien der groei-energie in bouillonculturen van verschillenden ouderdom, bij 37° C. gekweekt, heb ik dezen invloed tegelijkertijd bij een temp. van 40° C. onder overigens volkomen dezelfde omstandigheden nagegaan. De basiscultuur bij 40° C. is op hetzelfde oogenblik met hetzelfde oogje uit dezelfde cultuur geënt, zoodat bij het begin der proef in beide basisculturen evenveel organismen aanwezig waren. Voor de uitkomsten hiervan vergelijke men tabel XXXII.

TABEL XXXII.

Verhoudingen der standaardtroebelingen, waarmee de culturen van organismen, die zich op de normale wijze vermeerderen, zouden moeten overeenstemmen, om gelijkwaardig te zijn aan de groeienergie der organismen, die in de basiscultuur bij 40° C. na verschillenden ouderdom der cultuur aanwezig zijn.

Volgn.	Ouderdom der basiscultuur.	Standaardtroebeling, waarmee de overeenting bij 37° C. overeenkomt.	Tijd, hiertoe noodig.	$n = \frac{T}{G}$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times$ A, B, enz.
1	4 u. 30 m.	B	210 m.	$n = \frac{210}{20,5} = 10,24$	$X = \frac{4545}{2^{10,24}} \times B = 3,76\ B = 6,02\ A$
2	8 u. 5 m.	B	185 m.	$n = \frac{185}{20,5} = 9,02$	$X = \frac{4545}{2^{9,02}} \times B = 8,75\ B = 14,00\ A$
3	24 u.	B	185 m.	$n = \frac{185}{20,5} = 9,02$	$X = \frac{4545}{2^{9,02}} \times B = 8,75\ B = 14,00\ A$
4	27 u. 25 m.	BC	195 m.	$n = \frac{195}{20,5} = 9,51$	$X = \frac{4545}{2^{9,51}} \times BC = 6,23\ BC = 13,71\ A$
5	31 u. 50 m.	D	210 m.	$n = \frac{210}{20,5} = 10,24$	$X = \frac{4545}{2^{10,24}} \times D = 3,76\ D = 17,30\ A$
6	71 u. 35 m.	C	200 m	$n = \frac{200}{20,5} = 9,75$	$X = \frac{4545}{2^{9,75}} \times C = 5,28\ C = 14,78\ A$
7	75 u. 5 m.	D	240 m.	$n = \frac{240}{20,5} = 11,22$	$X = \frac{4545}{2^{11,22}} \times D = 1,91\ D = 8,79\ A$
8	119 u. 40 m.	BC	240 m.	$n = \frac{240}{20,5} = 11,22$	$X = \frac{4545}{2^{11,22}} \times BC = 1,91\ BC = 4,20\ A$
9	123 u. 45 m.	BC	240 m.	$n = \frac{240}{20,5} = 11,22$	$X = \frac{4545}{2^{11,22}} \times BC = 1,91\ BC = 4,20\ A$
10	167 u. 40 m.	C	270 m.	$n = \frac{270}{20,5} = 13,12$	$X = \frac{4545}{2^{13,12}} \times C = \frac{1}{1,96}\ C = 1,43\ A$
11	191 u. 15 m.	CD	285 m.	$n = \frac{285}{20,5} = 13,90$	$X = \frac{4545}{2^{13,90}} \times CD = \frac{1}{3,36}\ CD = 1,10\ A$
12	238 u. 40 m.	CD	320 m.	$n = \frac{320}{20,5} = 15,61$	$X = \frac{4545}{2^{15,61}} \times CD = \frac{1}{11}\ CD = 0,34\ A$

Ook hier zien we als in de basiscultuur bij 37° C. eerst een stijging der groeienergie optreden. Hier hebben zich evenwel na 4 uur 30 min. bijna 4 × zooveel organismen ontwikkeld als bij 37° C, wat in overeenstemming is met hetgeen we voor de berekening van den generatieduur bij 40° C. in het vorige hoofdstuk vonden. Na 8 uur 5 min. is de groeienergie bij 40° C. nog bijna 2 maal zoo groot als bij 37° C. Na 24 uur is dit evenwel omgekeerd en is die bij 37° C. ruim 2 maal zoo groot als bij 40° C. De verklaring hiervoor is deze, dat na 24 uren de grootste energie reeds voorbij is. Het is toch duidelijk, dat door de grootere groeisnelheid bij 40° C. in den eersten tijd, waardoor dus spoediger als bij 37° C. eenzelfde aantal organismen zich ontwikkeld heeft, ook eerder de door de aanwezigheid der organismen in het leven geroepen nadeelige momenten in de basiscultuur bij 40° C. zich doen gelden en dus na korter duur van groei der basiscultuur de groeienergie haar hoogste punt heeft bereikt. Dit hoogste punt valt tusschen 8 uur 5 min. en 24 uur. Daar de nacht er tusschen lag, kon een bepaling in dien tijd niet gedaan worden.

Na 31 uren zijn de omstandigheden in beide basisculturen volkomen gelijk geworden. Bij de bepaling op hetzelfde oogenblik verricht was geen spoor verschil van troebelheid in de overentingen te zien; de beide basisculturen blijven ook verder gelijkwaardig.

Ook hier voldoet de methode. Door terugrekening vinden we na 4 uur 30 min. (een tijd, waarin de generatieduurbepalingen nog verricht mogen worden) een troebeling overeenkomende met 6,02 A. De troebeling van de basiscultuur bij 40° C. kwam op dat oogenblik overeen met standaardtroebeling D en D = bijna 5 A.

Aangezien ik me alleen heb voorgesteld met een paar voorbeelden aan te geven, hoe volgens de nieuwe methode ter bepaling van den generatieduur der bacteriën de groei-energie van culturen van verschillenden ouderdom bepaald kan worden, waardoor tevens een beoordeeling der nadeelige momenten, die in deze culturen hun werking ontvouwen, mogelijk gemaakt is, zijn geen meerdere bepalingen voor dit en andere organismen gedaan behalve voor Bac. diphtheriae, waar een eigenaardig verschijnsel, hetwelk in het volgende hoofdstuk behandeld zal worden, zulks wenschelijk maakte.

VIJFDE HOOFDSTUK.

INVLOED VAN EEN TEMPERATUUR VAN 39—40° C. OP DEN GROEI VAN BAC. DIPHTHERIAE IN NEUTRALEN VOEDINGSBOUILLON.

Bij de generatieduur bepalingen van Bac. diphtheriae in neutralen voedingsbouillon bij een temperatuur van 36—37° C. en 39—40° C. deed ik, zooals reeds aan het einde van hoofdstuk III met een enkel woord medegedeeld werd, de eigenaardige ervaring op, dat, terwijl onder overigens volkomen gelijke omstandigheden Bac. diphtheriae bij 36—37° C. in bouillon vrij goed groeit, zoodat gemiddeld de generatieduur 75′ bedraagt, bij 39—40° C. na dagen zelfs geen spoor van troebeling in den bouillon zichtbaar is. Dit nu kwam me belangrijk genoeg voor om hierop nader in te gaan.

Bij het nazien der litteratuur over Bac. diphtheriae vond ik in een arbeid van Roux en Yersin (1) vermeld, dat boven 40° C. geen groei in bouillon plaats vindt en bij 39,5° C. de vermeerdering veel langzamer geschiedt dan bij 35—37° C., een analoge waarneming dus. Daarbij dient evenwel in aanmerking genomen te worden, dat zij grootere hoeveelheden, namelijk $^1/_2$ en 1 c. c. van een bouilloncultuur voor de overenting gebruikten dan bij mijne bepalingen het geval is.

Hoe vaak ik de proef ook deed, steeds bleef de bouillon na enting van een oogje van 1,1 mgr. volkomen helder. Interessanter werd evenwel de questie, toen ik de bouillonculturen, nadat ze 24 uren bij 39—40° C. gestaan hadden,

1) Annales de l'Institut Pasteur 1890.

plaatste bij 36—37° C., bij welke temperatuur de organismen zich anders goed vermeerderen. Nu was ook bij deze temperatuur na 6 dagen zelfs geen spoor van troebeling waar te nemen. Daaruit volgt dus direkt, dat bij overenting van kleine hoeveelheden organismen niet alleen bij 39—40° C. geen vermeerdering plaats vindt, maar bovendien deze temperatuur, welke slechts 3° C. verschilt van de normale lichaamstemperatuur, een zoodanigen nadeeligen invloed op Bac. diphtheriae uitoefent, dat na bepaalden tijd hare groei bij 36—37° C. onmogelijk geworden is.

Aangezien het me nu opviel, dat door langdurige overenting in bouillon deze invloed zich eenigszins wijzigt, was het wenschelijk me eerst hieromtrent een idée te vormen en daarbij tevens na te gaan, welke tijd van verblijf bij 39—40° C. voldoende is om daarna de vermeerdering bij 36—37° C. niet te doen plaats vinden en dit voor opeenvolgende overentingen in bouillon.

Daartoe werd een overenting van een agar-agarcultuur in bouillon gemaakt. Was deze bouilloncultuur bij 36—37° C. flink troebel geworden, dan maakte ik hiervan met hetzelfde oogje van 1,1 mgr. twee overentingen in 5 c. c. bouillon en plaatste de eene cultuur bij 36—37° C., de andere bij 39—40° C.

Terwijl in geregelde opeenvolging uit de culturen, bij 36—37° C. gegroeid, twee overentingen in bouillon plaats vonden, waarvan er wederom een bestemd was voor de broedstoof van 36—37° C. en een voor die van 39—40° C., plaatste ik de bouillonculturen, die aan den invloed van een temp. van 39—40° C. waren blootgesteld, na verschillende tijden bij 36—37° C. en ging dan na, óf en zoo ja, na welken tijd de bouillon troebel werd.

Zoo kan men zich in opeenvolgende overentingen een oordeel vormen over den tijd, waarin een temp. van 39—40° C.

de vermeerdering van kleine hoeveelheden van Bac. diphtheriae bij 36—37° C. in bouillon onmogelijk maakt.

Hiervan geeft de volgende tabel een overzicht.

TABEL XXXIII.

Kleine hoeveelheden van *Bac. diphtheriae*, in bouillon gedurende eenigen tijd aan den invloed van een temp. van *39—40° C.* blootgesteld en daarna geplaatst bij *36—37° C.*

Volgnummer.	Duur van inwerking van een temp. van 39—40° C.	Resultaat.	Tijdstip, waarop de cultuur na plaatsing bij 36—37° C. troebel is.	Aard der troebeling op dit tijdstip.
1	24 uren	Geen troebeling	—	Geen troebeling na 6 dagen.
2	24 uren	„	—	„
3	30 uren	„	—	„
4	24 uren	„	—	„
5	24 uren	„	—	„
6	12 uren	„	36 uren	Zeer sterk troebel. Geen troebeling na 12 uren.
7	14 uren	„	—	Geen troebeling na 6 dagen.
8	12 uren	„	24 uren	Tamelijk troebel. Geen troebeling na 12 uren.
9	24 uren	„	Mislukt	—
10	Mislukt	—	—	—
11	24 uren	Geen troebeling	—	Geen troebeling na 6 dagen.
12	12 uren	„	19 uren	Zeer licht troebel.
	24 uren	„	24 uren	Sterk troebel.
13	24 uren	„	24 uren	Sterk troebel. Geen troebeling na 12 uren.
14	26 uren	„	22 uren	Tamelijk troebel.
	48 uren	„	24 uren	Sterk troebel. Geen troebeling na 12 uren.
15	14 uren	„	46 uren	Zeer sterk troebel.
	36 uren	„	24 uren	Sterk troebel. Geen troebeling na 12 uren.
16	11 uren	„	13 uren	Zeer licht troebel.
	24 uren	„	—	Geen troebeling na 6 dagen.
17	24 uren	„	—	„
	48 uren	„	—	„
18	24 uren	„	24 uren	Tamelijk troebel.
	48 uren	„	—	Geen troebeling na 6 dagen.
19	24 uren	„	24 uren	Zeer sterk troebel.
20	24 uren	„	24 uren	„

Uit deze serie waarnemingen volgt:

1°. Bij een temp. van 39—40° C. is na 24 uren geen vermeerdering van Bac. diphtheriae in neutralen voedingsbouillon merkbaar.

Uit vroegere waarnemingen weten we, dat in dienzelfden tijd bij een temp. van 36—37° C. minstens 12,15 generaties hebben plaats gevonden.

2°. Een temp. van 39—40° C. oefent een nadeeligen invloed uit op kleine hoeveelheden van Bac. diphtheriae, geënt in neutralen voedingsbouillon en wel zoodanig, dat in 24 uren óf de vermeerdering van dit organisme in bouillon bij 36—37° C. onmogelijk gemaakt is óf, zoo deze al mogelijk is, zeer veel langzamer geschiedt.

Waar in de eerste 11 waarnemingen een verblijf van 24 uren bij een temp. van 39—40° C. voldoende is om daarna den groei bij 36—37° C. op te heffen, doen n° 6 en 8 zien, dat na 12 uren dit niet het geval is. Hier is respectievelijk na 36 en 24 uren de bouillon flink troebel geworden. Evenwel mag uit het feit, dat na 12 uren bij 36—37° C. zich nog geen spoor van troebeling vertoonde, terwijl in dien tijd de culturen, die te voren *niet* aan een temp. van 39—40° C. zijn blootgesteld, duidelijk troebel waren (hetgeen om ruimte te sparen in de tabel niet is opgeteekend), direkt afgeleid worden, dat ook een verblijf van 12 uren bij een temp. van 39—40° C. een nadeeligen invloed heeft uitgeoefend.

In de laatste 9 waarnemingen is een tijdsverloop van 24 uren, een enkele maal zelfs van 48 uren, bij 39—40° C. niet voldoende om daarna de vermeerdering bij 36—37° C. op te heffen. Edoch, al is de invloed minder absoluut, bestaan blijft ze. N° 14 en 15 toch doen zien, dat na 12 uren bij 36—37° C. nog geen troebeling aanwezig is.

3°. Door langdurige overenting in bouillon wordt de nadeelige invloed van een temp. van 39—40° C. minder.

Na aldus nagegaan te hebben, welk lot Bac. diphtheriae *in kleine aantallen* bij een temp. van 39—40° C. in neutralen voedingsbouillon ondergaat, kwam het me belangrijk voor te trachten dien nadeeligen invloed van een temp. van 39—40° C. voor een *groot* aantal organismen vast te stellen.

Hiertoe werd de weg ingeslagen, in het vorige hoofdstuk voor Bact. coli comm. bewandeld, toen het er om te doen was de energie voor de vermenigvuldiging van Bact. coli comm. in bouillonculturen van verschillenden ouderdom te beoordeelen. Dit trok mij te meer aan om tevens de daar besproken variant van de nieuwe methode ter bepaling van den generatieduur der bacteriën op ruimer schaal te kunnen toepassen.

Men is nu in staat, door twee volkomen gelijke jonge bouillonculturen van Bac. diphtheriae, waarin zich een groot aantal op dit oogenblik met volle energie ten aanzien van de snelheid van vermenigvuldiging bedeelde organismen bevindt, te vervaardigen en dan de eene cultuur bij 36—37° C., de andere bij 39—40° C. te plaatsen, door na verschillende voor de twee culturen (basisculturen) gelijke tijden uit beiden een oogje in bouillon over te enten, met behulp van de in het vorige hoofdstuk uitgewerkte formules: $n = \frac{T}{G}$ en $X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times$ A, B enz. te beoordeelen, hoe Bac. diphtheriae zich in culturen van verschillenden ouderdom bij temperaturen van 36—37° C. en 39—40° C. gedraagt ten aanzien van zijn groeienergie in bouillon. Daaruit is dan tevens de invloed van een verhoogden warmtegraad van 3° C. af te leiden.

De resultaten zijn in een viertal series neergelegd en hiervan geven de volgende tabellen een overzicht (zie volgende pag.). Opgemerkt dient te worden, dat de bouillonculturen, waardoor de energie der organismen ten aanzien van de vermenigvuldiging bij verschillenden ouderdom der basisculturen bij 36—37° C. en 39—40° C. bepaald wordt, gegroeid zijn bij 36—37° C., een temperatuur, waarbij als gemiddelde waarde voor den generatieduur van Bac. diphtheriae in bouillon in hoofdstuk III gevonden is: 75′.

Tot het oogenblik, waarop de twee basisculturen een lichte troebelheid van den bouillon vertoonen en waarna de eene cultuur bij 36—37° C. en de andere bij 39—40° C. geplaatst is, zijn beiden gegroeid bij 37° C.; van af dit oogenblik begint de rekening van den ouderdom der basisculturen.

De uitdrukking: — A en + E wil zeggen, dat voor de nacht de troebelheid der cultuur minder dan A en 's morgens grooter dan E was.

Haast overbodig is de mededeeling, dat telkenmale vóór de overenting in bouillon met een oogje de twee basisculturen flink geschud werden, zoodat de verdeeling der organismen in de basisculturen zooveel mogelijk gelijkmatig was. Deze opmerking geldt ook voor de basisculturen van Bact. coli commune, waarvan in het vorige hoofdstuk sprake was.

TABEL XXXIV. *Bac. diphtheriae*, slechts *éénmaal* in lakmoesblauw neutralen voedingsbouillon overgeënt.

Volgnummer.	Ouderdom der basis-culturen.	Basiscultuur bij 37° C. 16 uren oud. Troebeling = C = 2,8 A.				Basiscultuur bij 40° C. 16 uren oud. Troebeling = C = 2,8 A.			
		Standaardtroebeling, waarmee de overenting overeenstemt bij 36—37° C.	Tijd, hiertoe noodig.	$n = \frac{T}{G}$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times A$, B enz.	Standaardtroebeling, waarmee de overenting overeenstemt bij 36—37° C	Tijd, hiertoe noodig.	$n = \frac{T}{G}$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times A$, B enz.
1	0 uren	A	12,25 uren	$n = \frac{735}{75} = 9,8$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^{9,8}} \times A = 5,1$ A	A	12,25 uren	$n = \frac{735}{75} = 9,8$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^{9,8}} \times A =$ 5,1 A
2	6 uren	+ E	17,5 uren	$n = \frac{1050}{75} = 14,0$	$X = + \frac{1}{3,6} E = +1,9$ A	C D	17,5 uren	$n = \frac{1050}{75} = 14,0$	$X = \frac{1}{3,6}$ CD = 1,0 A
3	12 uren	A	12 uren	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X =$ 5,7 A	C D	17 uren	$n = \frac{1020}{75} = 13,6$	$X = \frac{1}{2,7}$ CD = 1,4 A
4	24 uren	A	12,25 uren	$n = \frac{735}{75} = 9,8$	$X =$ 5,1 A	C D	23,5 uren	$n = \frac{1410}{75} = 18,8$	$X = \frac{1}{100}$ CD = 0,04 A
						— A	24 uren	$n = \frac{1440}{75} = 19,2$	$X =$ — 0,0075 A
5	36 uren	A	12 uren	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X =$ 5,7 A	+ E	36 uren	$n = \frac{2160}{75} = 28,8$	$X = + \frac{1}{100000} E = +0,00007$ A
6	48 uren	A	11,5 uren	$n = \frac{690}{75} = 9,2$	$X =$ 7,7 A	B	31,5 uren	$n = \frac{1890}{75} = 25,2$	$X = \frac{1}{8333}$ B = 0,0002 A
7	60 uren	C	12 uren	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X = 5,7$ C = 16 A	0	6 dagen	——	$X =$ 0
8	72 uren	AB	11,75 uren	$n = \frac{705}{75} = 9,4$	$X = 6,73$ AB = 8,7 A	0	6 dagen	——	$X =$ 0
9	84 uren	C	12 uren	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X = 5,7$ C = 16 A	0	6 dagen	——	$X =$ 0
10	96 uren	A	11 uren	$n = \frac{660}{75} = 8,8$	$X =$ 10,2 A	0	6 dagen	——	$X =$ 0

TABEL XXXV. *Bac. diphtheriae*, slechts *éénmaal* in lakmoesblauw neutralen voedingsbouillon overgeënt.

Volgn.	Ouderdom der basis-culturen	Basiscultuur bij 37° C. 16 uren oud. Troebeling = CD = 3,7 A. Standaardtroebeling, waarmee de overenting overeenstemt bij 36—37° C.	Tijd, hiertoe noodig	$n = \frac{T}{G}$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times$ A, B, enz.	Basiscultuur bij 40° C. 16 uren oud. Troebeling = CD = 3,7 A. Standaardtroebeling, waarmee de overenting overeenstemt bij 36—37° C	Tijd, hiertoe noodig.	$n = \frac{T}{G}$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times$ A, B, enz.
1	0 uren.	A	12 uren.	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X = \frac{4545}{2^{9,6}} \times A = 5,7$ A	A	12 uren.	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X = \frac{4545}{2^{9,6}} \times A = 5,7$ A
2	6 uren.	+ E	17,25 uren.	$n = \frac{1035}{75} = 13,8$	$X = + \frac{1}{3,14} E = +2,2$ A	DE	17,25 uren.	$n = \frac{1035}{75} = 13,8$	$X = \frac{1}{3,14} DE = + 1,9$ A
3	12 uren.	C	11,5 uren.	$n = \frac{690}{75} = 9,2$	$X = 7,7$ C $= 21,5$ A	E	17,5 uren.	$n = \frac{1050}{75} = 14,0$	$X = \frac{1}{3,6} E = 1,9$ A
4	24 uren.	C	12,25 uren.	$n = \frac{735}{75} = 9,8$	$X = 5,1$ C $= 14,3$ A	— A	12,25 uren.	$n = \frac{735}{75} = 9,8$	$X = -5,1$ A
						+ E	24 uren.	$n = \frac{1440}{75} = 19,2$	$X = + \frac{1}{133} E = +0,0525$ A
5	30 uren.	+ E	17,25 uren.	$n = \frac{1035}{75} = 13,8$	$X = + \frac{1}{3,14} E = + 2,2$ A	D	22,75 uren.	$n = \frac{1365}{75} = 18,2$	$X = \frac{1}{66,3} D = 0,07$ A
6	36 uren.	B	11,5 uren.	$n = \frac{690}{75} = 9,2$	$X = 7,7$ B $= 12,3$ A	A	19,75 uren.	$n = \frac{1185}{75} = 15,8$	$X = 0,08$ A
7	48 uren.	C	12,25 uren.	$n = \frac{735}{75} = 9,8$	$X = 5,1$ C $= 14,3$ A	B	23,5 uren.	$n = \frac{1410}{75} = 18,8$	$X = \frac{1}{25} B = 0,064$ A
8	60 uren.	AB	11,25 uren.	$n = \frac{675}{75} = 9,0$	$X = 8,8$ AB $= 11,4$ A	C	24,25 uren.	$n = \frac{1455}{75} = 19,4$	$X = \frac{1}{152} C = 0,02$ A
9	72 uren.	A	12,25 uren.	$n = \frac{735}{75} = 9,8$	$X = 5,1$ A	B	23,75 uren.	$n = \frac{1425}{75} = 19,0$	$X = \frac{1}{115} B = 0,014$ A
10	84 uren.	A	11,25 uren.	$n = \frac{675}{75} = 9,0$	$X = 8,8$ A	B	23,5 uren.	$n = \frac{1410}{75} = 18,8$	$X = \frac{1}{25} B = 0,064$ A
11	96 uren.	A	12 uren.	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X = 5,7$ A	DE	25,25 uren.	$n = \frac{1515}{75} = 20,2$	$X = \frac{1}{265} DE = 0,02$ A
12	122 uren.	E	21,75 uren.	$n = \frac{1305}{75} = 17,4$	$X = \frac{1}{38,1} E = 0,19$ A	C	27 uren.	$n = \frac{1620}{75} = 21,6$	$X = \frac{1}{699} C = 0,004$ A
13	144 uren.	+ E	23,5 uren.	$n = \frac{1410}{75} = 18,8$	$X = + \frac{1}{100} E = +0,07$ A	DE	29,5 uren.	$n = \frac{1770}{75} = 23,6$	$X = \frac{1}{2610} DE = 0,002$ A

TABEL XXXVI.

Bac. diphtheriae, herhaalde malen overgeënt in lakmoesblauw neutralen voedingsbouillon.

Volgnummer.	Ouderdom der basis-culturen.	Basiscultuur bij 37° C. 16 uren oud. Troebeling = C = 2,8 A.			Basiscultuur bij 40° C. 16 uren oud. Troebeling = C = 2,8 A.		
		Standaardtroebeling, waarmee de overenting overeenstemt bij 36—37° C.	Tijd, hiertoe noodig.	$n = \frac{T}{G}$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times$ A, B, enz.	Standaardtroebeling, waarmee de overenting overeenstemt bij 36—37° C.	Tijd, hiertoe noodig.	$n = \frac{T}{G}$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times$ A, B, enz.
1	0 uren	A	12,5 uren	$n = \frac{750}{75} = 10,0$	$X = \frac{4545}{2^{10}}$ A = 4,5 A	A	12,5 uren	$n = \frac{750}{75} = 10,0$	$X = \frac{4545}{2^{10}}$ A = 4,5 A
2	7 uren	C D	17 uren	$n = \frac{1020}{75} = 13,6$	$X = \frac{1}{2,7}$ C D = 1,3 A	C	17 uren	$n = \frac{1020}{75} = 13,6$	$X = \frac{1}{2,7}$ C = 1,04 A
3	12 uren	A	12 uren	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	X = 5,7 A	B	19 uren	$n = \frac{1140}{75} = 5,2$	$X = \frac{1}{8,3}$ B = 0,19 A
4	50 uren	+ E	22 uren	$n = \frac{1320}{75} = 17,6$	$X = + \frac{1}{43,7}$ E = + 0,16 A	B	28 uren	$n = \frac{1680}{75} = 22,4$	$X = \frac{1}{1217}$ B = 0,0013 A
5	72 uren	+ E	24 uren	$n = \frac{1440}{75} = 19,2$	$X = + \frac{1}{133}$ E = + 0,05 A	0	6 dagen	—	X = 0
6	84 uren	A	12 uren	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	X = 5,7 A	0	6 dagen	—	X = 0

TABEL XXXVII.

Bac. diphtheriae, herhaalde malen overgeënt in lakmoesblauw neutralen voedingsbouillon.

Volgnummer.	Ouderdom der basisculturen.	Basiscultuur bij 37° C. 16 uren oud. Troebeling = C = 2,8 A.				Basiscultuur bij 40° C. 16 uren oud. Troebeling = C = 2,8 A.			
		Standaardtroebeling, waarmee de overenting overeenstemt bij 36—37° C.	Tijd, hiertoe noodig.	$n = \frac{T}{G}$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times A, B,$ enz.	Standaardtroebeling, waarmee de overenting overeenstemt bij 36—37° C.	Tijd, hiertoe noodig.	$n = \frac{T}{G}$	$X = \frac{2^{12,15}}{2^n} \times A, B,$ enz.
1	0 uren.	A	12 uren.	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X = \frac{4545}{2^{9,6}} \times A = 5,7$ A	A	12 uren.	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X = \frac{4545}{2^{9,6}} \times A = 5,7$ A
2	6 uren.	E	17,25 uren.	$n = \frac{1035}{75} = 13,8$	$X = \frac{1}{3,14} E = 2,2$ A	E	17,25 uren.	$n = \frac{1035}{75} = 13,8$	$X = \frac{1}{3,14} E = 2,2$ A
3	12 uren.	A	12 uren.	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X = 5,7$ A	E	18 uren.	$n = \frac{1080}{75} = 14,4$	$X = \frac{1}{4,76} E = 1,5$ A
4	30 uren.	+ E	18 uren.	$n = \frac{1080}{75} = 14,4$	$X = + \frac{1}{4,76} E = + 1,5$ A	C D	18 uren.	$n = \frac{1080}{75} = 14,4$	$X = \frac{1}{4,76}$ C D = 0,8 A
5	36 uren.	A	12 uren.	$n = \frac{720}{75} = 9,6$	$X = 5,7$ A	C	20 uren.	$n = \frac{1200}{75} = 16,0$	$X = \frac{1}{14,4}$ C = 0,19 A
6	48 uren.	B	12,25 uren.	$n = \frac{735}{75} = 9,8$	$X = 4,4$ B = 7,0 A	E	23,75 uren.	$n = \frac{1425}{75} = 19,0$	$X = \frac{1}{115} E = 0,03$ A
7	54 uren.	+ E	17,75 uren.	$n = \frac{1065}{75} = 14,2$	$X = + \frac{1}{4,14} E = + 1,6$ A	C	23 uren.	$n = \frac{1380}{75} = 18,4$	$X = \frac{1}{78,1}$ C = 0,037 A

Uit deze vier tabellen zien we:

1°. bij het ouder worden eener bouilloncultuur van Bac. diphtheriae, gegroeid bij 36—37° C., vindt een langzaam stijgen der groeienergie plaats, gevolgd door een zeer langzame daling in vergelijking met een cultuur van Bact. coli comm. onder dezelfde omstandigheden.

2°. een bouilloncultuur van Bac. diphtheriae, welke eerst 16 uren gegroeid is bij 37° C., in welken tijd een zoodanig troebeling ontstaan is, dat de generatieduurbepaling nog verricht mag worden en dus niet van afgestorven of in hunne vermeerdering belemmerde organismen sprake is, en welke daarna werd gebracht onder den invloed van een temp. van 39—40° C., vertoont in alle vier de serieproeven van af dit oogenblik een vermindering der groeienergie.

In tegenstelling met de basisculturen, welke bij 36—37° C. geplaatst zijn, worden de organismen door een temperatuurverschil van slechts 3° *C.* zoodanig geschaad, dat na 60 uren of geen organisme meer in staat is zich in verschen bouillon bij een temperatuur van 37° C. te vermeerderen, óf de groeienergie verminderd is tot op 2 % in vergelijking met het begin der proef.

In dienzelfden tijd van 60 uren is de groeienergie van een cultuur, welke bij 36—37° C. zich ontwikkeld heeft, zoo niet grooter, dan toch zeker er niet minder op geworden.

Ook voor een groot aantal van Bac. diphtheriae is een temperatuur van 39—40° C. een zeer schadelijke factor. Zooals de tabellen doen zien laat de regelmatigheid in de stijging en daling der groeienergie bij verschillenden ouderdom der culturen wel wat te wenschen over. In tegenstelling met Bact. coli comm. levert hier de methode minder mooie resultaten op. De oorzaak is niet ver te zoeken. De grootere verschillen toch, die bij de genera-

tieduurbepalingen in het derde hoofdstuk gevonden werden, doen zekerlijk hun invloed op de uitkomsten gelden. Bovendien bestaat de kans, dat door meerdere aaneenkleving der organismen in oudere culturen de gelijkmatigheid der verdeeling van de organismen in vergelijking met jonge culturen vermindert.

Hoe dit ook zij, de nadeelige invloed van een temperatuur van 39—40° C. op Bac. diphtheriae is boven bedenking verheven en het maakt geen verschil of men met een klein of een groot aantal organismen experimenteert.

Met speculatieve gevolgtrekkingen heb ik me tot nu toe niet bezig gehouden en wensch dit ook verder niet te doen, maar toch zou ik gaarne aan het einde van dit hoofdstuk even willen stilstaan bij een eigenaardige overeenstemming tusschen de hier vereenigde resultaten en waarnemingen, welke voor het dierlijk lichaam gedaan zijn.

Bekend is, dat in vergelijking met de meeste andere pathogene organismen, Bac. diphtheriae zeer spaarzaam in het bloed en de inwendige organen van den mensch tijdens het leven is aangetroffen, en waar dit het geval was werd de waarneming in hoofdzaak in het agonale tijdperk gedaan. Bac. diphtheriae behoort dan ook tot die organismen, wier werking op het menschelijk lichaam in hoofdzaak een toxische is. Als regel wordt dit organisme aan de oppervlakte van het lichaam (mondholte, pharynx, neus, huid, vagina, anus enz.) gevonden.

Nu verloopt diphtherie bijna altijd met koorts. Nemen we als gemiddelde okseltemperatuur een temp. van 38—39° C. aan, dan is de bloedstemperatuur, die, zooals de physiologie ons leert, $\frac{1}{2}$—1° C. hooger ligt, bij deze ziekte gemiddeld 39—39,5° C.

Aan de oppervlakte van het lichaam evenwel en speciaal in de pharynx is bij *geopenden mond* de temperatuur niet zoo hoog. Getallen zijn me hiervan niet bekend, maar wel mag in analogie met hetgeen voor de neusgangen waargenomen is, dat namelijk de ingeademde lucht bij een kamertemperatuur van ± 20° C. verwarmd wordt tot ± 30° C, aangenomen worden, dat bij geopenden mond de temperatuur in de pharynxholte niet meer dan ± 30° C. bedraagt.

In de pharynx wordt Bac. diphtheriae in hoofdzaak op den bodem der membranen gevonden en de hier heerschende temperatuur is de resultante van de bloedstemperatuur aan de eene en de temperatuur van de koudere luchtstroom, die langs de membranen strijkt, aan de andere zijde, daarbij in aanmerking genomen, dat in de membraan zelf geen warmte wordt geproduceerd. De zich hier bevindende evenwichtstemperatuur zal dus zeker niet hooger dan 37° C. liggen.

Is het nu niet een eigenaardige overeenkomst?

Aan den eenen kant de belemmerde vermeerdering, ja zelfs afsterving van den diphtheriebacil in vitro bij een temp. van 39—40° C., terwijl deze zich onder overigens gelijke omstandigheden bij een temp. van 36—37° C. goed vermenigvuldigt en aan den anderen kant het zoo uiterst spaarzaam voorkomen van dit organisme in het bloed en de inwendige organen van den mensch, waar gemiddeld de koortstemperatuur 39—39,5° C. bedraagt, terwijl de bacil op den bodem der membranen in zoo groote hoeveelheden aangetroffen wordt?

ZESDE HOOFDSTUK.

INVLOED VAN ALCALI EN ZUUR OP DE ONTWIKKELING VAN BACT. COLI COMMUNE IN BOUILLON, NAGEGAAN MET BEHULP VAN DE NIEUWE METHODE TER BEPALING VAN DEN GENERATIEDUUR DER BACTERIËN.

Bij de bespreking der nieuwe methode ter bepaling van den generatieduur der bacteriën werd als een speciaal voordeel opgemerkt, dat men er in korten tijd een reeks van bepalingen mee kan verrichten. De plicht rust op me dit door een voorbeeld nader te staven.

Daartoe heb ik den invloed van regelmatig stijgende hoeveelheden alcali (NaOH) en zuur (HCl) op den groei van Bact. coli comm. in voedingsbouillon bij 37° C. nagegaan, met het doel om primo de grenswaarden te leeren kennen, waarbij een vermeerdering van dit organisme mogelijk is, hetgeen door meerdere onderzoekers werd nagegaan, en secundo me een oordeel te vormen over den invloed van verschillende percentgehalten alcali en zuur op den groei van Bact. coli comm.

De resultaten van de voornaamste onderzoekingen op dit gebied, in de litteratuur neergelegd, zijn in het kort de volgende:

Heim: de optimumalcalescentie voor waterbacteriën is 1—1,5 c. c., voor miltvuur 0,5 c. c. % normaal natronloog.

Deeleman: de optimumalcalescentie voor de meeste organismen is 0,34—1,7 c. c. % norm. NaOH en 0,39—1,95 c. c. % normaal soda; de grenswaarde, waarbij vermeerdering nog mogelijk is, ligt voor NaOH tusschen 1,7 en 3,4 c. c. % normaal, voor soda tusschen 1,95 en 3,9 c. c. % normaal.

Boër: een belemmering in groei treedt op voor Bac. anthracis, Bac. diphtheriae, Bac. typhi en Bac. cholerae respectievelijk bij 0,8 c. c., 0,8 c. c., 1,3 c. c. en 0,5 c. c. % normaal HCl. en 4,0 c. c., 4,0 c. c., 7,0 c. c. en 7,0 c. c. % normaal NaOH.

Voor de beoordeeling van verschillende percentgehalten alcali en zuur in hun invloed op den groei van Bact. coli comm. ging ik nu aldus te werk.

Door toevoeging van natronloog wordt een hoeveelheid voedingsbouillon sterk alcalisch gemaakt, opgekookt en na afkoeling gefiltreerd; daarna wordt flink zoutzuur toegevoegd, weer opgekookt en gefiltreerd en vervolgens wordt deze bouillon gebracht op het neutraalpunt voor blauw lakmoespapier, waarna ze in hoeveelheden van 5 c. c. in buisjes wordt verdeeld.

Door middel van geijkte pipetten, waarvan de capaciteit van één druppel berekend is, worden in meerdere buisjes verschillende aantallen druppels van normaal NaOH-, $^1/_2$ normaal NaOH-, normaal HCl.- en $^1/_2$ normaal HCl. oplossingen gebracht, waardoor buisjes bouillon van verschillend alcali en zuurgehalte zijn verkregen.

De voorafgaande toevoeging van natronloog en zoutzuur is noodig om te verhinderen, dat later bij het alcaliseeren en zuur maken van den bouillon daarin een neerslag optreedt, hetgeen voor de bepaling van den generatieduur met de methode door vergelijking met standaardtroebelingen absoluut ongewenscht is. Mits men zorg draagt deze toevoeging niet te overdrijven, is ze niet van invloed op de voedingswaarde der bouillon, zooals de hier volgende waarden voor den generatieduur bij neutrale reactie van den bouillon in vergelijking met die, welke vroeger gevonden zijn, laten zien.

Een serie van deze buisjes met verschillende hoeveelheden

alcali en zuur wordt nu tegelijkertijd geënt met een oogje van 1,1 mgr. uit een bouilloncultuur van Bact. coli comm., die in troebelheid overeenstemt met een der bekende standaardtroebelingen; daarna worden ze geplaatst bij een temp. van 37° C. en nu wacht men het tijdstip af, waarop de buisjes een lichte troebeling der bouillon vertoonen.

Aldus is op zeer eenvoudige wijze de generatieduur van Bact. coli comm. in bouillon van verschillend alcali en zuurgehalte bij een temp. van 37° C. te berekenen.

Wanneer in de bouillonculturen met de hoogere percentgehalten alcali en zuur na 30—36 uren geen vermeerdering van organismen merkbaar is, wordt van deze culturen ongeveer het twintigste gedeelte met steriele pipetten in neutralen bouillon overgeënt en nu verder nagegaan, of thans nog vermeerdering van organismen plaats vindt. Door de overenting van een alcalische of zure bouilloncultuur in neutralen bouillon wordt de reactie slechts zoo weinig gewijzigd, dat de groei van Bact. coli comm. daardoor geen noemenswaardige belemmering ondervindt.

Van vier serieproeven geven de volgende twee tabellen een overzicht.

De schrijfwijzen — A en + E willen ook hier zeggen, dat voor de nacht de troebeling der cultuur geringer is dan die van standaardtroebeling A en den volgenden morgen deze grooter is dan E.

TABEL XXXVIII.

Bact. coli comm. 1 oogje = 1.1 mgr. geënt in 5 c. c. voedingsbouillon van verschillend alcali- en zuurgehalte. Temp. 37° C.

Reactie van den bouillon	Serie I				Serie II.				Serie III.			
	Vergelijking.	n.	T.	G.	Vergelijking.	n.	T.	G.	Vergelijking.	n.	T.	G.
Neutraal t.o van blauw lakmoes	I D en II E	12,75	255 m.	20′	I E en II D	11,54	260 m.	22′32″	I CD en II D	12,50	270 m.	21′36″
0,35 c.c. % norm. NaOH . . .	I D en II E	12,75	255 m.	20′	I E en II D	11,54	260 m.	22′32″	I CD en II D	12,50	270 m.	21′36″
0,80 c.c. „ „ „	I D en II D	12,15	255 m.	20′59″	I E en II CD	11,18	260 m.	23′15″	I CD en II CD	12,15	270 m.	22′13″
1,15 c.c „ „ „	I D en II C	11,43	255 m	22′19″	I E en II B	10,02	270 m.	26′57″	I CD en II CD	12,15	305 m.	25′12″
1,60 c.c. „ „ „	I D en II B	10,63	275 m.	25′52″	I E en II B	10,02	295 m.	29′26″	I CD en II C	11,79	360 m.	30′32″
1,95 c.c. „ „ „	I D en II A	9,95	300 m.	30′ 9″	I E en II A	9,34	365 m.	39′ 5″	I CD en II E	13,11	545 m.	41′34″
2,40 c.c. „ „ „	I D en II C	11,43	450 m	39′22″	I E en II B	10,02	555 m.	55′23″	I CD en II — A I CD en II + E	— 10,30 + 3,11	550 m. 1620 m	+ 53′ — 123′
2,75 c.c. „ „ „	I D en II — A I D en II + E	— 9,95 + 12,75	525 m. 1575 m.	+ 53′ — 128′	I E en II — A I E en II + E	— 9,34 + 12,15	555 m. 1440 m.	+ 59′ — 118′	I CD en II — A I CD en II + E	— 10,30 + 13,11	550 m. 1620 m.	+ 53′ — 123′
3,20 c.c. „ „ „					Geen troebeling na 36 uren. Geënt in neutralen bouillon. *Geen* troebeling.				Geen troebeling na 30 uren. Geënt in neutralen bouillon. *Geen* troebeling.			
3,55 c.c. „ „ „					Idem.				Idem.			
0,45 c.c „ „ HCl.	I D en II D	12,15	255 m	20′59″	I E en II B	10,42	270 m.	25′54″	I CD en II C	11,43	280 m.	24′29″
1,06 c.c. „ „ „	I D en II B	10,63	340 m.	31′59″	I E en II A	9,34	415 m.	44′26″	I CD en II CD	12,15	410 m.	33′44″
1,51 c.c. „ „ „	Geen troebeling na 30 uren. Geënt in neutralen bouillon. *Geen* troebeling.				Geen troebeling na 36 uren. Geënt in neutralen bouillon. *Wel* troebeling.				Geen troebeling na 30 uren Geënt in neutralen bouillon. *Geen* troebeling.			
2,12 c c. » „ „	Idem.				Geen troebeling na 36 uren. Geënt in neutralen bouillon. *Geen* troebeling.				Idem.			

Tabel XXXIX.

Bact. coli comm. 1 druppel = 50 mgr. geënt in 5 c. c. voedingsbouillon van verschillend alcali- en zuurgehalte. Temperatuur 37° C.

Reactie van den bouillon.	Serie IV.			
	Vergelijking.	n.	T.	G.
Neutraal t.o. van blauw lakmoes.	I B en II C	7,45	155 m.	20′ 48″
0,80 c.c. % norm. NaOH	I B en II B	6,64	155 m.	23′ 21″
1,60 „ „ „ „	I B en II C	7,45	195 m.	26′ 11″
2,40 „ „ „ „	I B en II A	5,93	290 m.	48′ 54″
2,75 „ „ „ „	I B en II A	5,93	330 m.	55′ 39″
3,20 „ „ „ „	I B en II — A	— 5,93	390 m.	+ 66′
	I B en II + E	+ 8,77	1695 m.	— 194′
3,55 „ „ „ „	Geen troebeling na 30 uren. Geënt in neutralen bouillon. *Geen* troebeling.			
0,45 c.c. % norm. HCl.	I B en II E	8,77	195 m.	22′ 14″
1,06 „ „ „ „	I B en II C	7,45	265 m.	35′ 34″
1,51 „ „ „ „	I B en II A	5,93	1695 m.	286′
2,12 „ „ „ „	Geen troebeling na 30 uren. Geënt in neutralen bouillon. *Geen* troebeling.			

Ten aanzien der laatste tabel dient allereerst vermeld, dat voor de enting van 1 druppel met een capaciteit van 50 mgr. in stede van 1 oogje van 1,1 mgr. capaciteit, zooals dat tot dusverre het geval was, een nieuwe tabel voor de aantallen plaats gevonden generaties bij overeenstemming met een der standaardtroebelingen dient berekend te worden. Ter besparing van ruimte is deze niet in haar geheel opgegeven, maar volsta ik met de mededeeling, dat de uiterste waarden uiteen loopen van 3,84 tot 9,45 generaties.

De vier serieproeven nu doen zien:

1° De waarden voor G. van Bact. coli comm. in neutralen voedingsbouillon komen overeen met de in hoofdstuk III gevondene. Of men kleine (1 oogje) of grootere (1 druppel) hoeveelheden overent levert voor de berekening van den generatieduur geen noemenswaardig verschil op.

2° Bij eenzelfde percentgehalte van den bouillon aan alcali en zuur komen in de eerste drie seriën, waar de verhoudingen geheel dezelfde zijn, de waarden vrij wel overeen, met dien verstande evenwel, dat hoe grooter de toename is, hoe dichter men de grenswaarde nadert, waarbij eene vermeerdering nog mogelijk is, hoe hooger waarde men dus voor den generatieduur vindt, des te meer de onderlinge waarden uiteenloopen.

De verklaring hiervan is eenvoudig deze, dat primo bij het grooter worden van T de fout met de methode gemaakt naar evenredigheid toeneemt en secundo bij de meer ongunstige percentgehalten aan alcali en zuur kleinere verschillen hierin een grooteren invloed op de uitkomsten uitoefenen.

3° Een regelmatige stijging der hoeveelheden alcali en zuur gaat niet gepaard met een regelmatige verlenging van den generatieduur d. i. een regelmatige minder snelle vermenigvuldiging van Bact. coli comm.

Bij de geringere alcali- en zuurgraden is de invloed op den generatieduur van minder beteekenis. Bij het stijgen worden de voorwaarden tot vermeerdering der organismen in een snel tempo veel ongunstiger.

4° De percentgehalten alcali en zuur, waarbij geen zichtbare vermeerdering van Bact. coli comm. in bouillon plaats heeft, bedragen voor kleine hoeveelheden 3,20 c c % normaal NaOH en 1,51 c c % normaal HCl. Deze grenswaarden liggen zeer dicht bij de waarden, welke noodig zijn om de organismen in den tijd van 30 uren zoodanig te benadeelen, dat daarna geen vermeerdering in zeer licht alcalischen of zuren bouillon mogelijk is.

5°. Of men een groot of klein aantal organismen aan den nadeeligen invloed van sterkere percentgehalten alcali of zuur blootstelt, levert slechts een klein verschil op in

dien zin, dat een grooter aantal meer weerstand biedt.

6°. Bact. coli commune verdraagt beter alcali dan zuur.

7°. De optimum reactie voor Bact. coli comm. in bouillon ligt tusschen neutraal en 0,35 c c % normaal NaOH ten opzichte van blauw lakmoespapier.

Met deze bepalingen bezig zijnde kwam ik op de gedachte om eens na te gaan, of door voortdurende overenting van Bact. coli comm. in bouillon met meer ongunstige percentgehalten alcali op den duur dit organisme hieraan meer te gewennen zou zijn en aldus de grenswaarden, waarbij nog vermeerdering mogelijk is, voor dit organisme zouden verschoven kunnen worden.

Voor dat doel werd Bact. coli comm. achtereenvolgens twintig maal steeds uit een 2,40 c c % norm. alcalische bouilloncultuur overgeënt in 2,40 c c, 275 c c en 3,20 c c % norm. alcalischen bouillon (waarbij de grens voor vermeerdering der organismen ligt) en nu werd gecontroleerd, of na 24—48 uren bij 37° C vermeerdering merkbaar is.

Al is dit onderzoek vrijwel negatief uitgevallen, zoo verdient toch dit verschijnsel de opmerkzaamheid, dat wanneer een enkele maal vermeerdering in *3,20 c. c.* % normaal alcalischen bouillon was te constateeren en nu uit deze cultuur een groote hoeveelheid ($^1/_4$ c. c.) werd overgeënt in 2,40 c. c. % normaal alcalischen bouillon, in welken bouillon bij overenting uit een *2,40 c. c.* % norm. alcalische bouilloncultuur steeds vermeerdering van organismen plaats vond, dit thans absoluut niet het geval was.

Hieruit volgt dus, dat wanneer in 3,20 c. c. % norm. alcalischen bouillon zichtbare vermeerdering van organismen plaats heeft, zich daaraan binnen korten tijd een snelle afsterving aansluit.

Ten slotte vergeleek ik de overentingen uit een bouillon-cultuur, die te voren twintig maal in *2,40 c. c. % normaal alcalischen bouillon* was overgeënt met de overentingen uit een cultuur, die steeds in *neutralen* bouillon was gegroeid.

Men vergelijke de tabel hieronder.

TABEL XL.

Reactie der bouillon.	*Bact. coli comm., geruimen tijd* gekweekt in bouillon, *neutraal* ten opzichte van blauw lakmoespapier. 1 oogje = 1,1 mgr. overgeënt in voedingsbouillon van verschillend alcali- en zuurgehalte. Temperatuur 37° C. Generatieduur.	*Bact. coli comm., twintig maal* gekweekt in bouillon *2,40 c. c. % normaal alcalisch* ten opzichte van blauw lakmoespapier. 1 oogje = 1,1 mgr. overgeënt in voedingsbouillon van verschillend alcali- en zuurgehalte. Temperatuur 37° C. Generatieduur.
Neutraal.	G = 22′ 36″	G = 24′ 32″
0,45 c.c. % norm. NaOH	G = 23′ 43″	G = 24′ 32″
1,25 c.c. „ „ „	G = 27′ 53″	G = 32′ 55″
1,60 c.c. „ „ „	G = 33′ 27″	G = 38′ 4″
2,40 c.c. „ „ „	Mislukt.	G = 67′
2,85 c.c. „ „ „	G = + 62′ / − 97′	G = 78′
3,20 c.c. „ „ „	Geen troebeling na 48 uren	G = 170′
0,5 c.c. % norm. HCl.	G = 23′ 43″	G = 25′ 38″
0,8 c.c. „ „ „	G = 26′ 25″	G = 30′ 11″
1,41 c.c. „ „ „	G = 36′ 40″	G = 75′

We zien hieruit, dat in geringe mate een gewenning aan grootere percentgehalten alcali is tot stand gekomen en tevens blijkt, dat in neutralen bouillon in de derde kolom de generatieduur verlengd is. Van groote beteekenis zijn de verschillen niet.

Het zij me vergund ten slotte de verwachting uit te spreken, dat de methode ter bepaling van den generatieduur der bacteriën door vergelijking met standaardtroebelingen voor meerdere onderzoekingen hare diensten zal verleenen.

STELLINGEN.

I.

De methode ter bepaling van den generatieduur der bacteriën door vergelijking met standaardtroebelingen is de meest geschikte voor het verrichten van een serie bepalingen in korten tijd.

II.

De opvatting, dat 37° C. de optimum temperatuur voor den groei van pathogene micro-organismen voorstelt, mag niet gegeneraliseerd worden.

III.

Voor een juiste bepaling van den generatieduur der bacteriën moet de overenting uit zeer jonge culturen geschieden.

IV.

Bij de beoordeeling van de energie ten aanzien der vermenigvuldiging eener bacteriëncultuur moet, naast de bepaling van het aantal doode en levende organismen, beteekenis toegekend worden aan de condities, waarin de levende verkeeren.

V.

In tegenstelling met meerdere andere pathogene organismen sterft de diphtheriebacil bij een koortstemperatuur van 39—40° C. in bouillon snel af.

VI.

De bepaling van den generatieduur der bacteriën is van waarde voor de differentieering van in vele opzichten overeenkomende micro-organismen.

VII.

Ten aanzien van het verleenen van pensioen en de uitkeering van verzekeringsfondsen moet onder bepaalde omstandigheden beteekenis toegekend worden aan een verband tusschen het optreden van acuut gewrichtsrheumatisme en een daaraan voorafgegaan trauma.

VIII.

Het is onjuist „paralysis cordis" als oorzaak van den dood op te geven.

IX.

Het is gewenscht bij de sluiting van punctie-openingen, gemaakt tot ontlasting van stuwingsvocht, agrafes te gebruiken.

X.

De door von Kries voorgestelde nomenclatuur van de partieel kleurenblinden (protanopie, deuteranopie en tritanopie) verdient de voorkeur boven de meer gebruikelijke indeelingen volgens Helmholtz en Hering.

XI.

Voor de beoordeeling van de bacteriologische verhoudingen in het darmkanaal van menschen en dieren vormt de bepaling van den steriliteits-index (Alex. Klein) de eenige juiste maatstaf.

XII.

Op het slagveld dient de aseptische wondbehandeling de antiseptische te vervangen.

XIII.

De voor het leger h. t. l. geldende bepaling, dat, wanneer in een garnizoen febris typhoïdea epidemisch heerscht, geene militairen dat garnizoen met verlof mogen verlaten, terwijl dit verbod niet geldt, wanneer

een epidemie van scarlatina, diphtheritis of dysenterie is opgetreden, kan niet op wetenschappelijke gronden verdedigd worden.

XIV.

Het verdient de voorkeur, dat de opleiding van miliciens-hospitaalsoldaten plaats heeft in enkele groote garnizoensplaatsen.

XV.

Onafhankelijk van alle voorbereidende studiën worde het recht tot het voeren van den titel Doctor in de Geneeskunde alleen aan dien (die) arts verleend, welke de verdediging van een zelf bewerkt proefschrift en bijgevoegde stellingen heeft op zich genomen.